

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I,
der Medizinischen Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Tierexperimentelle Untersuchungen zu
antioxidativen Enzymen und
Hitzeschockproteinen als endogene
Schutzsysteme bei Herzinsuffizienz**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Karsten Mydlak
aus Cottbus

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Schimke
 2. Priv. Doz. Dr. med. Siems
 3. Prof. Dr. med. Richter

Datum der Promotion: 16. September 2002

Zusammenfassung

Gesteigerter oxidativer Stress ist ein typisches Zeichen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Anhand von 2 Rattenmodellen sollen charakteristische Veränderungen des enzymatischen antioxidativen Systems, repräsentiert durch die Glutathionperoxidase (GSH-Px) und Superoxiddismutase (SOD) sowie Änderungen im Hitzeschockproteinsystem (Hsp) untersucht werden, für das stellvertretend Hsp25 und Hsp72 bestimmt wurden. Daneben wurde die Lipidperoxidation durch die Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) quantifiziert. Im ersten Rattenmodell, der Hypertonie-induzierten Herzinsuffizienz durch permanente Renin-Angiotensin-System-Aktivierung in doppelt transgenen Ratten konnte eine linksventrikuläre Hypertrophie mit CK-Isoenzym-Shift mit vermehrter Expression von CK-MB und -BB beobachtet werden. Es kam in beiden Ventrikeln der transgenen Tiere zu einer Zunahme der Lipidperoxidation begleitet von einer Erniedrigung der Serum-Vitamin E-Konzentration durch Verbrauch. SOD und Hsp72 blieben unverändert. Durch die biventrikuläre Zunahme der GSH-Px-Aktivität bei linksventrikulär erhöhtem Hsp25-Gehalt konnte die Toleranz gegenüber Hypoxie/Reoxygenierungsstress erhöht werden. In der 2. Teilstudie - der Myokardinfarkt-induzierten Herzinsuffizienz - wurden die Parameter oxidativer Schädigung und antioxidativen Schutzes im Akutstadium (14-16h) und 3, 6 und 9 Wochen nach experimentellem Infarkt (MI) bestimmt. In der Akutphase zeigten sich in beiden Ventrikeln und im Papillarmuskel gesteigerte GSH-Px- und SOD-Aktivitäten, ohne dass kardiale Hypertrophie vorlag. Hsp72 und Hsp25 waren während der Akutphase nach MI im Papillarmuskel und im linken Ventrikel erhöht. In der Folge resultiert eine verbesserte kontraktile Funktion bei experimentellem Hypoxie/Reoxygenierungsstress. Damit gelang es erstmals eine Selbstprotektion des Myokards während eines akuten MI nachzuweisen. Erst ab der 6. Woche trat kardiale Hypertrophie auf, begleitet vom charakteristischen CK-Isoenzym-Shift. Während die SOD und die Hitzeschockproteine nach der akuten Phase auf das Niveau der Kontrollen absanken, blieb die hohe GSH-Px-Aktivität im linken Ventrikel über den gesamten Untersuchungszeitraum bestehen, bei zunehmender Toleranz des Herzens gegenüber Hypoxie/Reoxygenierungsstress. Die vorgelegten tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass das Herz sowohl unter akut als auch unter chronisch gesteigertem oxidativen Stress Mechanismen zur Selbstprotektion aktivieren kann, die eine Prävention bzw. Minimierung von Schädigungsreaktionen durch Sauerstoffradikale ermöglichen.

Schlagnworte: Herzinsuffizienz, Sauerstoffradikale, antioxidative Enzyme, Hitzeschockproteine

Abstract

Elevated oxidative stress is typical in the pathogenesis of heart failure. Characteristical changes in antioxidant enzyme status, represented by glutathionperoxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), and changes in heat shock protein status (Hsp), denoted by Hsp25 and Hsp72, have been revealed in two different rat-models. Lipidperoxidation was quantified by the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In the first model of heart failure caused by permanent activation of renin-angiotensin system in double transgenic rat, leftventricular hypertrophy accompanied by a shift of creatine kinase (CK) isoenzyme pattern to higher concentration of fetale CK-MB an -BB-isoforms was found. Higher TBARS concentrations and lower alpha-tocopherol levels caused by consumption have been measured. SOD and Hsp72 remained unchanged. The tolerance against experimental hypoxia/reoxygenation was improved by higher levels of GSH-Px and Hsp25 in both right and left ventricular tissue.

In the second study of heart failure caused by experimental myocardial infarction (MI) the parameters of oxidant demolishing and antioxidant defence were evaluated under acute conditions (14-16h) and 3, 6 and 9 weeks after infarction. In the acute period higher activities of GSH-Px and SOD in non-hypertrophied left and right ventricular tissue and papillary muscle have been reported. Leftventricular and papillary muscle Hsp25 and Hsp72 content showed higher levels 14-16 hours after MI compared with controls, improving the contractile function in hypoxia/reoxygenation experiments. These findings suggest for the first time a myocardial self-protection after acute myocardial infarction. 6 and 9 weeks after MI leftventricular hypertrophy occurred attended by the characteristic CK-isoenzymeshift. While SOD-activity and Hsp-content decreased to the levels of the controls, GSH-Px remained on higher altitude in leftventricular tissue in all examined periods after MI. This was accompanied by better tolerance against hypoxia/reoxygenation stress.

These findings of experimental-induced heart failure show the activation of myocardial self protecting mechanisms under acute and chronic oxidative stress conditions, minimizing or even preventing demolishing reactions of oxygen radicals.

Keywords: remodeling, oxygen radicals, antioxidant enzymes, heat shock proteins

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1. Herzinsuffizienz	3
2.1.1. Herzhypertrophie	5
2.1.2. Das Creatinkinase (CK)-System	6
2.1.2.1. Die CK und ihre Isoenzyme	6
2.1.2.2. Die CK bei kardialer Hypertrophie	8
2.2. Sauerstoffradikale in der Pathogenese der Herzinsuffizienz	8
2.2.1. Sauerstoffradikale	8
2.2.1.1. Charakteristika ausgewählter reaktiver Sauerstoffspezies	9
2.2.1.2. Sauerstoffradikale als physiologische und pathophysiologische Stoffwechselprodukte	10
2.2.1.3. Sauerstoffradikalinduzierte Schädigungsreaktionen	12
2.2.2. Das antioxidative System	15
2.2.2.1. Das enzymatische System	15
2.2.2.2. Das nichtenzymatische System	18
2.2.3. Hitzeschockproteine (Hsp)	19
2.2.4. Sauerstoffradikale, Antioxidatives System, Stressproteine und Herzinsuffizienz	20
2.2.5. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung	21
3. PROBLEMSTELLUNG	23
4. MATERIALIEN UND METHODEN	24
4.1. Materialien	24
4.1.1. Geräte	24
4.1.2. Chemikalien	25
4.2. Methoden	26
4.2.1. 1.Tiermodell: Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie bei transgenen Ratten (TGR)	26
4.2.2. 2.Tiermodell: Myokardinfarkt-induzierte Herzhypertrophie bei Ratten	26
4.2.3. Proben- und Plasmagewinnung	27
4.2.4. Aufarbeitung der Gewebeproben für die biochemischen Untersuchungen	27
4.2.5. Aktivitätsbestimmung der Creatinkinase	28
4.2.6. Elektrophoretische Bestimmung des Creatinkinase-Isoenzymmusters	29

4.2.7. Aktivitätsbestimmung der Glutathionperoxidase (GSH-Px)	30
4.2.8. Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase (SOD)	31
4.2.8.1. Differenzierung der SOD-Isoenzyme	33
4.2.9. Bestimmung der Lipidperoxid-Konzentration	34
4.2.10. Bestimmung der Vitamin E-Konzentration im Serum	35
4.2.11. Bestimmung von Hsp25 und Hsp72	35
4.2.12. Proteinbestimmung	37
4.2.13. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung	37
4.2.14. Statistische Auswertung	38
5. ERGEBNISSE	39
5.1. Ergebnisse 1.Tiermodell: Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie bei transgenen Ratten (TGR)	39
5.1.1. Körpergewicht, Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex	39
5.1.2. Myokardialer CK-Gehalt und CK-Isoenzymmuster	41
5.1.3. Myokardiale antioxidative Enzyme	43
5.1.4. Serum-Vitamin E-Gehalt	44
5.1.5. Lipidperoxidation	45
5.1.6. Stressproteine	45
5.1.7. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung	46
5.2. Ergebnisse 2.Tiermodell: Myokardinfarktinduzierte Herzhypertrophie bei Ratten	49
5.2.1. Charakterisierung der Myokardinfarktphasen	49
5.2.2. Körpergewicht, Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex	50
5.2.3. Myokardialer CK-Gehalt und CK-Isoenzymmuster	52
5.2.4. Myokardiale antioxidative Enzyme	58
5.2.5. Lipidperoxidation	62
5.2.6. Stressproteine	63
5.2.7. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung	66
6. DISKUSSION	70
6.1. 1.Tiermodell: Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie bei transgenen Ratten (TGR)	70
6.1.1. Herzhypertrophie bei TGR	71
6.1.2. CK-Remodeling bei TGR	71
6.1.3. Antioxidative Enzyme und Lipidperoxidation bei TGR	72
6.1.4. Hitzeschockproteine bei TGR	74

III

6.1.5. Ursachen für Hypertrophie, CK-Remodeling und Induktion von antioxidativen Enzymen und Hsp bei TGR	75
6.1.6. Kardiale Funktion bei TGR	77
6.2. 2.Tiermodell: Myokardinfarkt-induzierte Herzhypertrophie bei Ratten	78
6.2.1. Akute Myokardinfarktphase (14-16 nach MI)	79
6.2.1.1. Hypertrophieparameter und Creatinkinase	79
6.2.1.2. Lipidperoxidation und antioxidative Enzyme	79
6.2.1.3. Hitzeschockproteine	80
6.2.1.4. Kontraktile Funktion	82
6.2.2. Chronische Phase nach Myokardinfarkt (3-9 Wochen nach MI)	82
6.2.2.1. Hypertrophieparameter und Creatinkinase	82
6.2.2.2. Lipidperoxidation und antioxidative Enzyme	82
6.2.2.3. Hitzeschockproteine	82
6.2.2.4. Kontraktile Funktion	82
6.3. Schlussfolgerungen	82
6.4. Therapeutische Konsequenzen	82
7. ZUSAMMENFASSUNG	82
8. LITERATUR	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ADP	Adenosin-Diphosphat
AngII	Angiotensin II
Asc	Ascorbinsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
CK	Creatinkinase
CrP	Creatinphosphat
CuZn-SOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase-Isoenzym
dF/dt_{\max}	maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit
dF/dt_{\min}	maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidase
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSG-R	Glutathionreduktase
Hsp	Hitzeschockprotein
Hsp25	25-kDa-Hitzeschockprotein
Hsp72	72-kDa-Hitzeschockprotein
MDA	Malondialdehyd
MI	Myokardinfarkt
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase-Isoenzym
PF	peak force
PI	Peroxidations-Index
RAS	Renin-Angiotensin-System
Sham	scheinoperierte Tiergruppe
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
t-SOD	Gesamt-Superoxiddismutase
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
TGR	transgene Ratte
vs.	versus
WT	wild-type Ratte
XOD	Xanthinoxidase

1. EINLEITUNG

In den Bevölkerungen industrialisierter Länder sind Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die wesentlichste Ursache eines frühzeitigen Todes. Sie sind in der Bundesrepublik Deutschland die häufigsten stationären Behandlungsanlässe; jeder fünfte Mann und jede siebente Frau wird unter dieser Hauptdiagnose im Krankenhaus versorgt. Herz-Kreislaufferkrankungen verursachten 1994, mit direkten Kosten von über 42,6 Milliarden DM, etwa 12,4% der direkten Gesamtausgaben für Gesundheit in der Bundesrepublik Deutschland. 1995 starben in der BRD insgesamt 183 736 Personen an ischämischen Herzkrankheiten, davon 87 739 Menschen am akuten Myokardinfarkt (MI). Damit war der Myokardinfarkt im Jahr 1995 die häufigste Einzeltodesursache überhaupt [1]. Die Gesamtzahl der akuten Herzinfarkte in der Bundesrepublik Deutschland beträgt ca. 240 000 / Jahr. Bei jedem 10. Patienten entwickelt sich nach überstandener MI eine Herzinsuffizienz. Die chronische Herzinsuffizienz ist in Deutschland mit einer Prävalenz von ca. 2% der Bevölkerung eine häufige und ernst zu nehmende Erkrankung. Die 1-Jahres-Sterblichkeit beträgt bei Patienten mit geringer Symptomatik und adäquater Therapie ca. 20%. Bei schwerer Symptomatik steigt sie trotz Therapie auf mehr als 50% [2]. Somit ist der klinische Verlauf der Herzinsuffizienz schlechter als bei den meisten Malignomen. Hinsichtlich der ätiologischen Faktoren der Insuffizienzentwicklung konnte in den letzten Jahren eine deutliche Umverteilung gesichert werden. Während in der Framingham-Studie die arterielle Hypertonie mit etwa 75% eindeutig dominierte, zeigen die epidemiologischen Daten neuerer Studien, wie in Abbildung 1 dargestellt, eine Verschiebung hin zur koronaren Herzkrankheit (KHK). Sie steht heute mit 50-75% ursächlich eindeutig im Vordergrund. Dieser Rückgang wird als Folge der verbesserten und konsequenteren antihypertensiven Therapie begründet [3]. Dennoch stellt die Hypertonie in der Bevölkerung auch weiterhin einen nicht zu unterschätzenden Risikofaktor für die Entstehung anderer Herz-Kreislaufferkrankungen dar. In der Bundesrepublik Deutschland haben nur ca. 55% der Bevölkerung normotensive Blutdruckwerte entsprechend der WHO-Definition ($< 140/90$ mmHg). Einen Borderline-Hypertonus haben 19,5% mit Werten zwischen 140/90 und 160/95 mmHg, und bei 19,8% liegt sogar ein Bluthochdruck mit Werten über 160/95 mmHg vor. Man geht davon aus, dass ein chronischer diastolischer Blutdruck > 105 mmHg das kardiovaskuläre Risiko verdoppelt und das Apoplexrisiko vervierfacht [4].

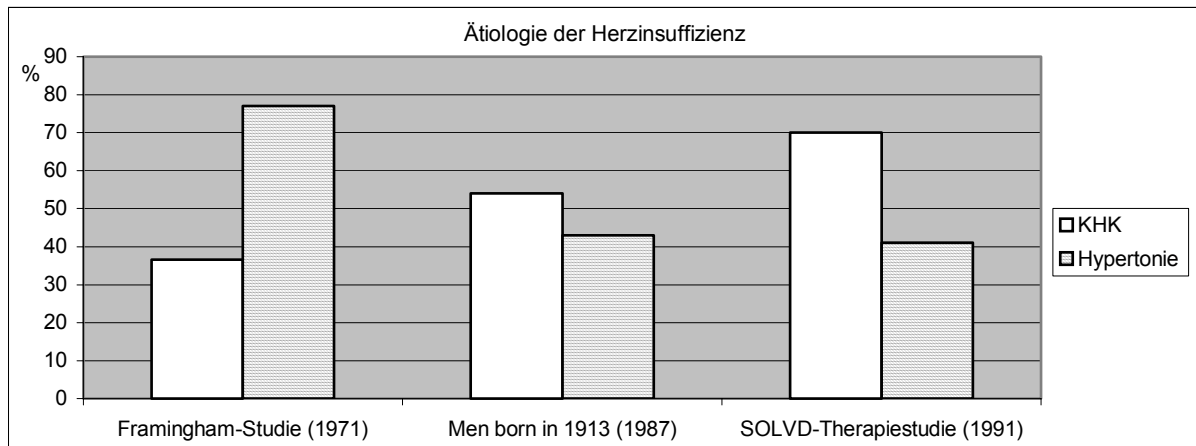


Abbildung 1: *Umverteilung der Herzinsuffizienz-Ätiologie*

Trotz deutlicher Erfolge in der Therapie und Prävention ischämischer Herzerkrankungen in den letzten Jahren ist die weitere Erforschung der genauen pathophysiologischen Vorgänge, die schließlich zur Herzinsuffizienzentstehung durch chronische Hypertonie und durch Myokardinfarkt führen, von großem Interesse. Die vorliegende Arbeit soll zum Grundverständnis der hypertrophieassoziierten biochemischen und funktionellen Prozesse im hypertrophierten Myokard beitragen und so die Entwicklung neuer Therapiekonzepte bzw. die Verbesserung bestehender anregen.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Herzinsuffizienz

Nach Braunwald [5] wird als Herzinsuffizienz „der Zustand des Herzens definiert, bei dem pathologische Veränderungen der Herzfunktion dazu führen, dass die pro Zeiteinheit ausgeworfene Blutmenge zur vollständigen Realisierung der metabolischen Prozesse in peripheren Organen nicht ausreicht oder der periphere Blutbedarf nur bei einem zu hohen Füllungsdruck realisiert werden kann“. Unter Berücksichtigung der Funktion vegetativer und neuronaler Regelkreise bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz hat Packer [6] eine erweiterte Definition formuliert, nach der die Herzinsuffizienz als „komplexes klinisches Syndrom, charakterisiert durch Störungen der linksventrikulären Funktion und der vegetativen und neurohumoralen Regulation, begleitet von Leistungsminderung, Flüssigkeitsretention und reduzierter Lebenserwartung“ zu verstehen ist. Der in Abbildung 2 dargestellte doppelte Circulus vitiosus zeigt schematisch die Bedeutung der vegetativen und neurohumoralen Stimulation im Rahmen der Herzinsuffizienzentwicklung. Diese Stimulation führt sowohl über den Weg struktureller als auch funktioneller Veränderungen zur Myokardschädigung.

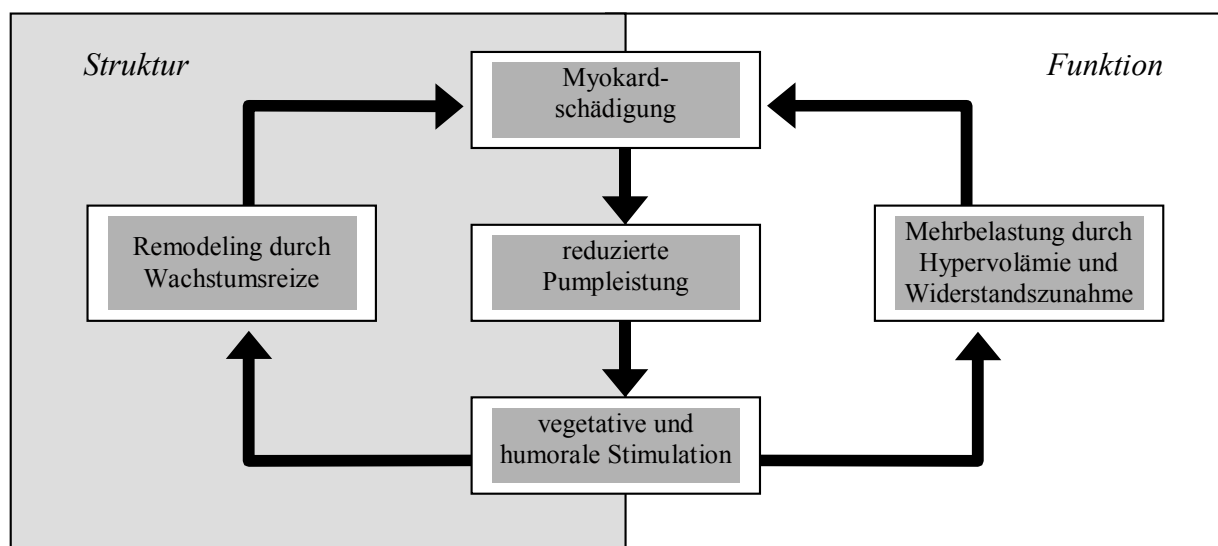


Abbildung 2: Doppelter Circulus vitiosus der Herzinsuffizienzentwicklung

Die Störung der Herzfunktion kann sich dabei akut (innerhalb von Sekunden bis Tagen) bzw. chronisch (innerhalb von Monaten bis Jahren) herausbilden. Die Herzinsuffizienz wird durch mechanisch induzierte Stoffwechselveränderungen im Herz (Drucküberlastung, Volumenüberlastung, Bewegungsbehinderung, Muskelfaserverlust) oder direkt metabolisch (Koronar-

sklerose, Myokarditis, Kardiomyopathie) verursacht. Die die Entwicklung einer Herzinsuffizienz einleitenden biochemischen Initialreaktionen, umfassen hypoxisch/ischämische, rheumatisch/entzündliche, pharmakologisch/toxische, endokrine und Hypertrophie-induzierende Elemente.

Als biochemisches Korrelat zur Kontraktilitätseinschränkung des Myokards werden u.a. Aktivitätseinschränkung des β -Rezeptor-Adenylatcyklase-Systems, verminderte Aktivität der myofibrillären ATPase, Veränderung des Myosinisoenzymmusters und Störung des Ca-Flusses beschrieben [7]. Als Reaktion auf die Dysfunktion des Myokards werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die eine Stabilisierung bzw. Steigerung der Herzleistung ermöglichen sollen. Wie von Eichhorn und Bristow [8] zusammenfassend dargestellt wurde, gehören zu diesen Kompensationsmechanismen entsprechend der zeitlichen Abfolge a) Zunahme der Herzfrequenz, b) Zunahme der Kontraktilität, c) Vorlastzunahme und d) Zunahme der Zahl kontraktiler Elemente. Von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung dieser Kompensationsmechanismen ist die Aktivitätssteigerung neuronal/autokrin-parakriner Systeme, insbesondere des adrenergen Systems und Renin-Angiotensin-Systems (RAS).

Die als Folge beobachteten strukturellen und funktionellen Umbauprozesse im Myokard werden unter „Myokardremodeling“ zusammengefasst. Myokardremodeling findet sich als physiologischer Vorgang bei Leistungssportlern und dient dort der Anpassung des Herzens an gesteigerte Leistungsanforderung. Myokardremodeling im Verlauf der Herzinsuffizienzentwicklung dient kurzzeitig ebenfalls zur Aufrechterhaltung der kardialen Leistung, verstärkt jedoch im Langzeitverlauf - wie in Abbildung 2 dargestellt - die myokardiale Dysfunktion. Nach Colucci [9] schließt das pathologische Myokardremodeling a) die Zunahme der Myokardmasse verbunden mit der Hypertrophie der Einzelmyozyten, b) die veränderte Genexpression mit bevorzugter Exprimierung fetaler Gene, c) die Änderungen in Qualität und Quantität der extrazellulären Matrix und d) die Apoptoseinduktion ein.

Am Beispiel der durch einen Myokardinfarkt hervorgerufenen Herzinsuffizienz weisen Blaufarb und Sonnenblick [10] darauf hin, dass das Remodeling zeitlich unterschiedlich auftretende, strukturelle und funktionelle Veränderungen beinhaltet. Zu den frühen Remodelingprozessen zählen sie den in der akuten Infarktphase eintretenden Zellverlust, gefolgt vom bindegewebigen Umbau und Narbenbildung im infarzierten Myokard. Die daraus resultierenden strukturellen Gewebeveränderungen, die in die Übergangsregion zum nichtinfarzierten Myokard hineinreichen, bilden die Grundlage für die Vergrößerung des infarzierten Gebietes. Zur Kompensation des Verlustes an funktionsfähigem Myokard reagiert das nichtinfarzierte Herz-

gewebe mit Dilatation und Myozytenhypertrophie. Endresultate sind ein vergrößerter Ventrikel, erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck, gesteigerte Wandspannung bei gleichzeitig nur mäßigem Vorteil hinsichtlich der Herzleistung. Von größerer Bedeutung auf dem Weg zur Herzinsuffizienz ist jedoch, wie von Blaufarb und Sonnenblick [10] ausgeführt wird, das „späte“ Remodeling im nichtinfarzierten, gut-perfundierten Myokard jenseits der akuten Infarktphase als Folge der hämodynamischen Belastung und permanent gesteigerten Wandspannung. Typische Zeichen des „späten“ Remodelings sind zunehmende Myokardhypertrophie, die über Reduzierung der Wandspannung eine zeitlich begrenzte Anpassung des Herzens an die gesteigerte hämodynamische Belastung ermöglicht. Wird die hämodynamische Überlastung nicht unterbrochen, stößt diese Kompensation durch Hypertrophie an ihre Grenzen. Gleichzeitig zunehmende Fibrosierung, Vergrößerung des Kammervolumens und letztlich hochgradige Dilatation führen dazu, dass das Herz „dekompensiert“, es wird „insuffizient“ mit der Konsequenz des Pumpversagens.

2.1.1. Herzhypertrophie

Hypertrophie bezeichnet die Zunahme der Herzmuskelmasse und kann prinzipiell alle Anteile des Herzens betreffen, ist aber in den Ventrikeln am ausgeprägtesten. Es werden nach morphologischen Kriterien zwei Formen der Hypertrophie unterschieden, die auch als Mischform auftreten können:

- (1) die durch eine Volumenbelastung erzeugte exzentrische Hypertrophie,
- (2) die auf einer Druckbelastung basierende konzentrische Hypertrophie.

Bei der Ersteren kommt es aufgrund der erforderlichen Erhöhung des Schlagvolumens und des größeren enddiastolischen Restvolumens zur Gefügedilatation, wohingegen das Ventrikelvolumen bei der konzentrischen Hypertrophie nahezu gleich bleibt.

Wie mechanische Belastung genau in Wachstum umgesetzt wird ist noch nicht vollständig geklärt. Kardiomyozyten scheinen äußere Belastung wahrnehmen zu können und in Reaktion darauf zu hypertrophieren. Es existieren eine Reihe von Daten, von Eichhorn und Bristow [8] zusammengefasst, die zeigen, dass sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen die Aktivierung des RAS einen potenten Hypertrophiestimulus darstellt. Dehnung von Kardiomyozyten als Folge erhöhter Wandspannung führt demnach zur autokrin-parakrinen Freisetzung von Angiotensin II (AngII) und Aktivierung der Proteinkinase C. Folge ist die Expression von Wachstum-induzierenden Genen, beispielsweise von c-fos, c-jun, und c-myc. Nakamura et al. [11] zeigten, dass eine Inhibition der durch Ang II und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) aus-

gelösten Hypertrophie von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten durch Antioxidantien wie BHA und Vitamin E erreicht werden kann. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass im Mechanismus der Hypertrophieentstehung auch die Bildung von Sauerstoffradikalen eine entscheidende Rolle spielt. Es wurde außerdem gezeigt, dass AngII direkt die Proteinsynthese stimuliert und so Hypertrophie in Zellmodellen und auf Organebene produziert.

Parallel zur kardialen Hypertrophie kommt es auch zu einer Interstitium-Fibrosierung des Herzmuskelgewebes. Die Stimulation der Kollagensynthese durch AngII sowie seine mitogene Wirkung auf Kardiofibroblasten könnten als Ursache angesehen werden. Hypertrophiereduktion unter β -Blockade lässt vermuten, dass auch adrenerge Mechanismen Hypertrophie-induzierend wirken. Andererseits können auch ischämische Episoden allein die Expression der oben beschriebenen wachstum-induzierenden Gene auslösen [12]. In Tierversuchen, aber auch in Gewebeproben aus humanem Herz wurden als adaptive Reaktion auf hämodynamische Belastungssituationen immer wieder die Reexpression fetaler Proteingene beobachtet, so beispielsweise für Isoformen von α -Aktin, Tropomyosin, β -Myosin und Creatinkinase [13].

2.1.2. Das Creatinkinase (CK)-System

Muskelkontraktionen und -relaxationen sind ATP-abhängig. Da die Zelle über nur sehr begrenzte ATP-Reserven verfügt, ist die permanente Regenerierung aus Glykogen und Triglyceriden notwendig. Dieser Metabolismus nimmt aufgrund der Komplexität seiner Reaktionen viel Zeit in Anspruch. Zur kurzfristigen Überbrückung gibt es das Reservoir an energiereichen Phosphorylgruppen in Form des Creatinphosphats (CrP), aus welchem die kontinuierliche Nachbildung von ATP durch die zytosolische Creatinkinase (CK) garantiert wird. Im ruhenden Muskel ist CrP die in größter Konzentration vorhandene energiereiche Verbindung.

2.1.2.1. Die CK und ihre Isoenzyme

In Abbildung 3 sind zusammenfassend die Wirkorte und -mechanismen der CK dargestellt. In der Erholungsphase wird Creatin durch die mitochondriale CK zu Creatinphosphat rephosphoryliert. Durch Lokalisation der mitochondrialen CK an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran ist ein enger Bezug zur oxidativen Phosphorylierung gegeben, als Garant für die schnelle Energiebereitstellung. Der Transport des gebildeten CrP aus dem Mitochondrium ins Zytosol, dem Ort des Energieverbrauchs (Kontraktion, Ionenkanäle, Synthesen), wird durch das CrP-Shuttle vollzogen. Dort erfolgt dann die Resynthese des ATP aus

ADP durch die zytosolische CK. Diese kann sowohl als freie lösliche Fraktion, als auch in Plasmamembran- oder Sarkolemm-assoziiierter Form vorliegen.

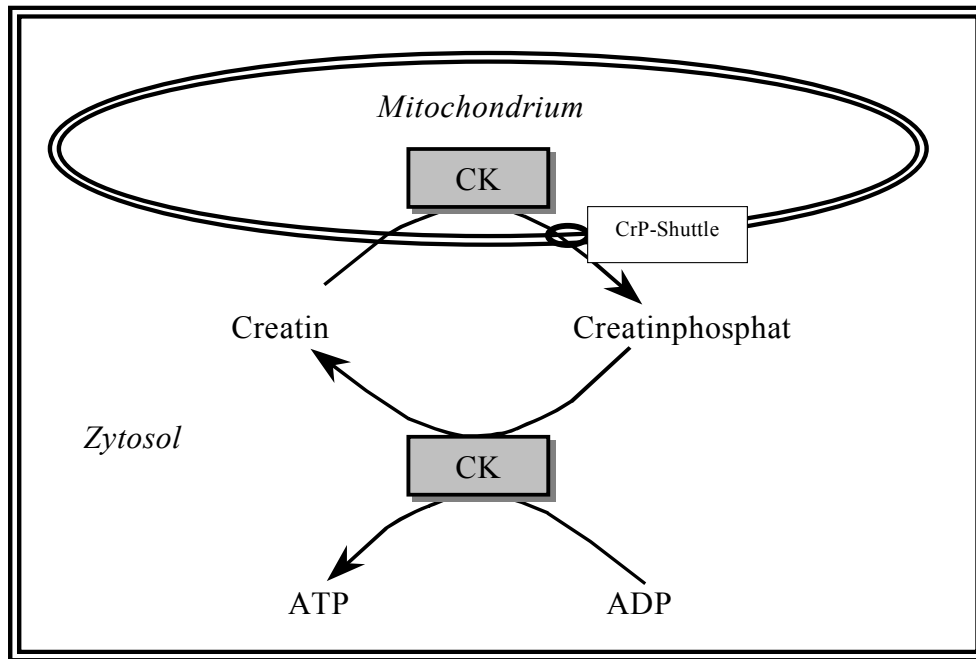


Abbildung 3: *Wirkungsorte und –mechanismen der Creatin-Kinase (CK)*

Aus tierischem und humanem Gewebe lassen sich 3 zytoplasmatische CK-Isoenzyme isolieren: die CK-MM, CK-MB und CK-BB, die aus monomeren Untereinheiten: M (= muscle) und B (= brain) bestehen. Aufgrund der Organverteilung der CK-Isoenzyme wird die CK-MM als Muskeltyp, die CK-MB als Myokardtyp und die CK-BB als Hirntyp bezeichnet. Die mitochondrialen Isoenzyme werden uneinheitlich als CK-Mi, CK-MiMi, mCK, CK-MT oder CK-mito abgekürzt.

Vergleicht man die *Michaelis-Konstanten* (K_M) zwischen CK-MB und CK-MM, so lässt sich erkennen, dass der K_M -Wert der CK-MB für Creatinphosphat kleiner (3,5 vs. 4,7) und für Creatin doppelt so groß ist (20,6 vs. 10,0). Beim CK-BB-Isoenzym verglichen mit der CK-MM verhält es sich gleichermaßen: K_M -Wert für Creatinphosphat 2,2 vs. 4,7. Dies bedeutet, dass die B-Isoformen eher den Abbau von CrP zu Creatin unter Bereitstellung von Energie in Form von ATP fördern, während die CK-MM eher die Energiespeicherung durch Synthese von CrP begünstigt.

2.1.2.2. *Die CK bei kardialer Hypertrophie*

Im geschädigten, vor allem aber hypertrophierten Myokard wird regelmäßig ein Verlust der CK-Gesamtaktivität verzeichnet, mit begleitender Veränderung des Isoenzymmusters [14]. 1976 konnte zum ersten Mal ein Anstieg des CK-MB-Anteils im hypertrophierten Myokard beobachtet werden [15]. Im Gegenzug nahm der prozentuale Anteil der CK-MM an der Gesamt-CK ab. Die Akkumulation der CK-MB-, aber auch der CK-BB-Isoenzyme kann unter dem Aspekt der oben erläuterten K_M -Werte als eine Adaptation an chronischen Energiemangel gewertet werden. Bei Hypoxie ist der CrP-Spiegel als Ausdruck einer ungenügenden oxidativen Phosphorylierung erniedrigt. Kompensatorisch steigen die Anteile der fetalen Isoenzyme mit B-Untereinheiten an, da durch diese aufgrund der höheren Affinität zu Creatinphosphat ein erheblich schnellerer Phosphattransfer erreicht werden kann [16]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CK-Mi spezifisch abnimmt, wofür ein erniedrigter Creatin-Pool als Ursache angesehen wird. Man geht davon aus, dass der Anstieg der fetalen CK-Isoenzyme charakteristisch für die kompensierenden Herzhypertrophie ist, während sich der Übergang von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz durch die zusätzliche Abnahme der CK-Mi auszeichnet [17].

2.2. *Sauerstoffradikale in der Pathogenese der Herzinsuffizienz*

Weniger bekannt ist, welche Reaktionswege von den unterschiedlichen mechanischen und metabolischen Initialreaktionen zum nahezu uniformen Erscheinungsbild der manifesten Herzinsuffizienz führen. Denkbar ist, dass Sauerstoffradikale, deren gesteigerte Bildung im Verlauf der aufgeführten pathophysiologischen Stoffwechselsituationen bekannt ist, als Mediatoren wirken.

2.2.1. **Sauerstoffradikale**

Der Begriff "Sauerstoffradikale" wird als Synonym für radikalische und nichtradikalische Moleküle (Tabelle 1) bezeichnet, die bei univalenter Reduktion von Sauerstoff oder in Reaktionen der primär gebildeten Spezies miteinander bzw. mit anderen Biomolekülen entstehen.

Die hervorstechendste Eigenschaft von Sauerstoffradikalen ist ihre Reaktionsfähigkeit. Sie ist eine notwendige Voraussetzung für physiologische Reaktionen (Fremdstoffmetabolisierung, Eikosanoidmetabolismus, Phagozytose, Synthese biogener Amine u.a.), kann aber auch über unspezifische Reaktionen zur Zellschädigung führen.

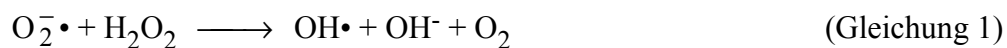
Spezies	Name	Bemerkung
$\text{O}_2^- \bullet$	Superoxidradikal	Bildung bei vielen Autooxidationsreaktionen
$\text{OH} \bullet$	Hydroxylradikal	Bildung metallkatalysiert aus Superoxidradikalen
$\text{HO}_2 \bullet$	Perhydroxyradikal	protonierte Form des Superoxidradikals
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	aus Superoxidradikalen und direkt aus O_2 gebildet
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff	wenig biologische Bedeutung
$\text{LO} \bullet$	Alkoxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$\text{LOO} \bullet$	Peroxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
LOOH	Lipidhydroperoxid	Lipidperoxidationsprodukt
$\text{L} \bullet$	Lipidradikal	Lipidperoxidationsprodukt
^-OCl	Hypochlorid	Myeloperoxidase-Reaktionsprodukt

Tabelle 1: *Reaktive Sauerstoffspezies (unter Verwendung von [18])*

2.2.1.1. Charakteristika ausgewählter reaktiver Sauerstoffspezies

Das Superoxidradikal

Superoxidradikale sind verglichen mit anderen freien Radikalen relativ träge Reaktionspartner, worauf sich auch ihre verhältnismäßig geringe Zytotoxizität zurückführen lässt. Größere Bedeutung haben die von ihnen ausgehenden Folgereaktionen, die zur Bildung von Hydroxylradikalen (*Haber-Weiss-Reaktion*) (Gleichung 1) und Singulett-Sauerstoff (Gleichung 2) führen.



Durch Spontandismutation werden Wasserstoffperoxid und Sauerstoff gebildet (Gleichung 3).



Durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert, wird die Geschwindigkeit der Dismutation um den Faktor 10^9 gesteigert.

Das Hydroxylradikal

Hydroxylradikale werden bei der sogenannten *Fenton-Reaktion* (Gleichung 4 und 5) gebildet, die im Prinzip nur die übergangsmetallkatalysierte Form der *Haber-Weiss-Reaktion* darstellt.



Unter den freien Radikalen gilt das Hydroxylradikal als besonders toxisch. Dies begründet sich zum einen durch die außerordentliche Reaktionsfreudigkeit, andererseits gibt es physiologischerweise keine effektiven, spezifischen Schutzmechanismen, wie sie für andere Sauerstoffradikale in Gestalt der Enzyme SOD und Katalase existieren. Entscheidende Folgen des Einwirkens von Hydroxylradikalen sind DNA-Destruktion und Initiation der Lipidperoxidation.

Wasserstoffperoxid

Die Toxizität des Wasserstoffperoxids wird ebenfalls durch Folgereaktionen erklärt. H_2O_2 als stabiles Zwischenprodukt allein besitzt kaum zellschädigende Wirkung. Erst die Produkte der oben beschriebenen *Haber-Weiss-* und *Fenton-Reaktion* führen zur Bildung von Sauerstoffspezies mit größerer toxischer Potenz (Gleichung 1 und 5).

Hypochlorit

Hypochlorit entsteht in Makrophagen als Produkt der Myeloperoxidase. Dieses Enzym wandelt das nach primärer Bildung von $\text{O}_2^- \cdot$ entstehende Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Halogeniden in Hypohalogenite (^-OCl , ^-OBr , ^-OI) um. Diese sind für die antimikrobiellen Fähigkeiten dieser Zellen unentbehrlich.

2.2.1.2. Sauerstoffradikale als physiologische und pathophysiologische Stoffwechselprodukte

Reaktive Sauerstoffspezies können entweder direkt bei der schrittweisen Reduktion von Sauerstoff oder als Ergebnis der Reaktionen primär gebildeter Sauerstoffradikale miteinander oder mit anderen Molekülen entstehen. Bei vielen dieser Reaktionen sind Übergangsmetalle als Katalysatoren beteiligt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Bildung durch

physikalische Einflüsse wie UV-Licht, Ultraschall, Röntgen- oder Gammastrahlung. Sie werden bei unterschiedlichsten Prozessen in verschiedenen Strukturen des Körpers gebildet:

Makrophagen

Nach ihrer Aktivierung erzeugen Makrophagen im Rahmen der sogenannten *Respiratory-burst-Reaktion* vermehrt Superoxidradikale. Diese wirken bakterizid und sind so im Rahmen des Immunsystems erwünschte und unentbehrliche Metabolite.

Mitochondrien

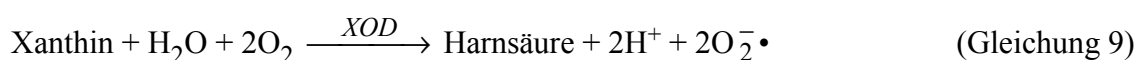
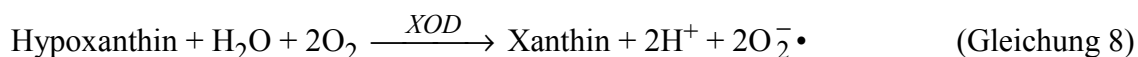
Superoxidradikale entstehen als unumgängliches Produkt der Atmungskette. Allerdings werden dabei nur ca. 1-4% des Elektronenflusses in $O_2^{\cdot -}$ umgesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass infolge von Ischämie-/Reperfusionstress die Sauerstoffradikalproduktion in den Herz-Mitochondrien ansteigt [19].

Peroxisomen

Peroxisomen kommen vor allem in Zellen mit hoher metabolischer Leistung vor, d.h. beispielsweise in Nieren- und Leberepithelien. In diesen Zellorganellen, die der Energiebereitstellung dienen (β -Oxidation, Fructoseabbau), werden durch verschiedene Oxidasen und Peroxidasen erhebliche Mengen an H_2O_2 gebildet. Die in diesem Kompartiment in hoher Konzentration vorkommende Katalase vermag einen Großteil davon zu eliminieren. Dennoch können bis zu 40% in das Zytoplasma übertreten [20].

Xanthinoxidasekonversion

1982 wurde eine Hypothese vorgelegt, nach der die Hauptquelle der bei Ischämie/Reperfusionvorgängen auftretenden Sauerstoffradikale in der Umwandlung der - unter physiologischen Bedingungen als Dehydrogenase reagierenden - Xanthinoxidoreduktase zur Oxidase zu suchen sei [21]. Die Xanthinoxidase (XOD) verwendet dabei Sauerstoff als Elektronenakzeptor und katalysiert folgende Reaktionen (Gleichung 8 und 9):



Beim Purinabbau unter Ischämie/Reperfusionstress fallen so nicht unerhebliche Mengen Superoxidanionen an.

Katecholamine

Erhöhter Sympathikotonus ist mit einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen verbunden, deren Abbau sowohl über die Monoaminoxidasen als auch über den Weg der Autooxidation freie Radikale entstehen lässt [22].

Eicosanoidbildung

Gesteigerte Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen aus Arachidonsäure, wie es auch während Ischämie der Fall ist, kann ebenfalls durch den stattfindende Elektronentransfer zur Bildung von radikalischen Sauerstoffabkömmlingen führen.

2.2.1.3. Sauerstoffradikalinduzierte Schädigungsreaktionen

Unter physiologischen Bedingungen werden Sauerstoffradikale nach ihrer Entstehung eliminiert und eine Schädigung so verhindert. Da Sauerstoffradikale in der Lage sind mit nahezu allen Biomolekülen zu reagieren, kann es bei vermehrter Bildung und/oder verminderter Metabolisierung zu zahlreichen Schädigungsprozessen kommen, die in Abbildung 4 zusammengefasst sind.

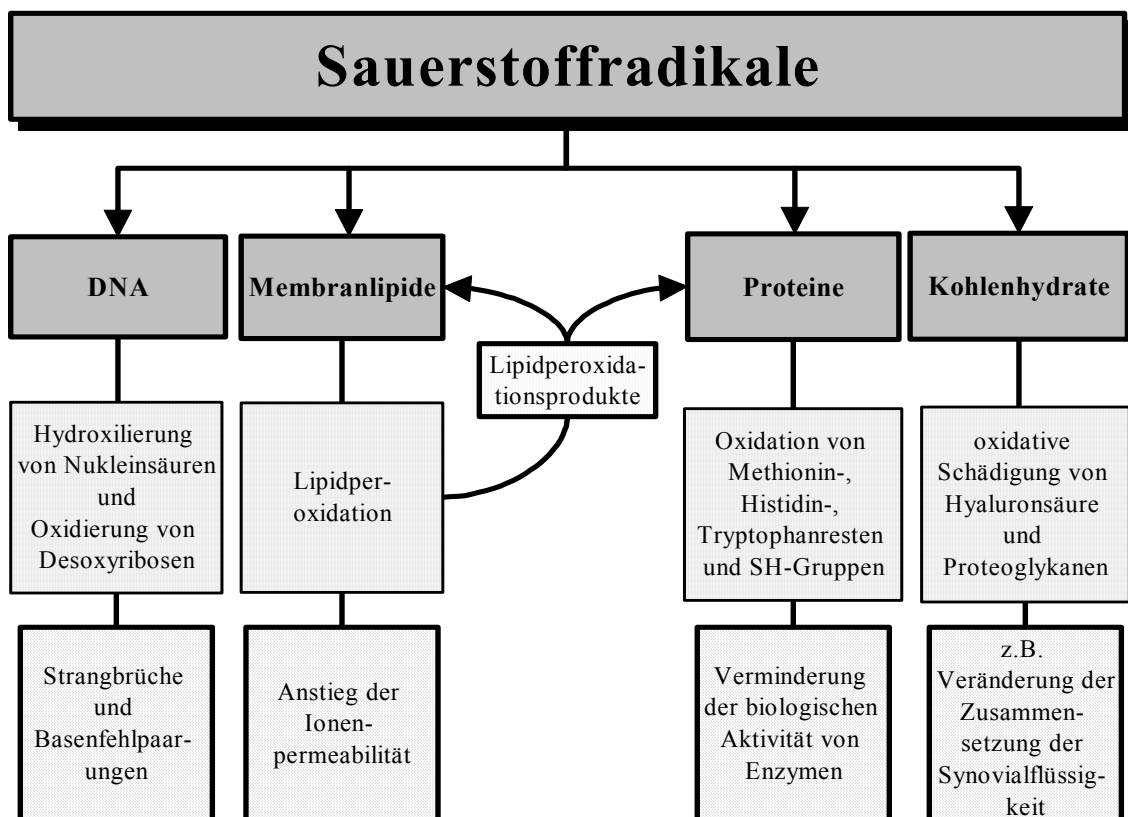
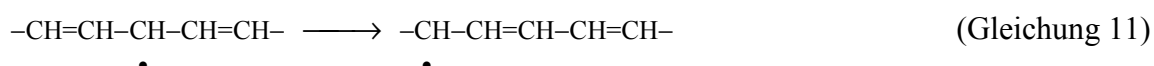
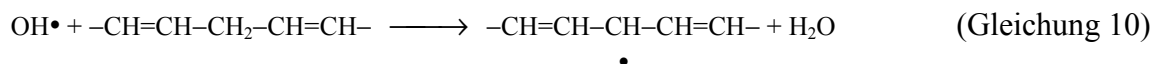


Abbildung 4: *Wirkung von Sauerstoffradikalen auf unterschiedliche Strukturen und deren Folgen*

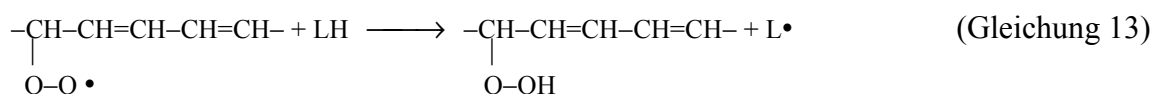
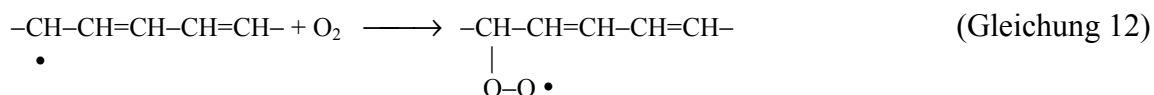
Lipidperoxidation

Um ihre Funktion und Fluidität aufrechterhalten zu können, brauchen die Membranen ungesättigte Fettsäuren. Diese sind der vornehmliche Angriffspunkt bei der Schädigung der Membranen durch Sauerstoffradikale, was als Lipidperoxidation bezeichnet wird. Diese verläuft, einmal initiiert, als Kettenreaktion, die prinzipiell über zwei Wege zur Schädigung führen kann: zum einen durch direkte Strukturveränderung der Membranen, zum anderen über indirekte Zerstörung von anderen Zellkomponenten durch die entstehenden reaktiven Aldehyde. Dabei reichen die Folgen je nach Ausmaß der Schädigung vom unspezifischen Anstieg der Ionenpermeabilität über die Beeinflussung membrangebundener Proteine bis hin zur vollständigen Destruktion der Membranen.

Urheber der Lipidperoxidation ist bevorzugt das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$), aber auch Perhydroxylradikale ($\text{HO}_2\cdot$) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) sind dazu in der Lage. Angriffspunkt für Hydroxylradikale ist dabei das α -Methylen-C-Atom unkonjugierter Doppelbindungen von polyungesättigten Fettsäuren. Dabei kommt es zunächst durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms zur Bildung eines Lipidradikals ($\text{L}\cdot$) (Gleichung 10). Dieses wird durch die nachfolgende Dien-Konjugation stabilisiert (Gleichung 11).



Die dabei ablaufende cis-trans-Isomerisierung der PUFA stellt bereits eine Störung des Membrangefüges dar. Im weiteren Verlauf kommt es durch Addition von Sauerstoff zur Entstehung des Peroxydradikals ($\text{LOO}\cdot$) (Gleichung 12). Dieses ist fähig Wasserstoff eines weiteren ungesättigten Fettsäuremoleküls (LH) zu abstrahieren und somit ein neues Lipidradikal ($\text{L}\cdot$) zu generieren (Gleichung 13).



Damit ist der Circulus vitiosus der Propagation ($\text{L}\cdot \rightarrow \text{LOO}\cdot \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$) eingeleitet. Lipidperoxide (LOOH) zerfallen entweder spontan oder übergangsmetallkatalysiert ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$)

unter Bildung von Alkoxy- ($\text{LO}\bullet$) und Peroxyradikalen ($\text{LOO}\bullet$).

Durch diese Mechanismen ist es möglich, dass sich die Propagation selbst unterhält, bis stabile Endprodukte gebildet werden, die ein weiteres Voranschreiten der Kettenreaktion nicht mehr möglich machen (Termination). Bei ausreichendem antioxidativen Potential erfolgt ein frühzeitiger Abbruch der Kettenreaktion. Ist dies nicht der Fall, werden im Verlauf von komplizierten Fragmentierungsreaktionen schließlich Aldehyde gebildet (Malondialdehyd [MDA], 4-Hydroxynonenal), die ihrerseits auf verschiedene Weise andere Zellkomponenten, vor allem Proteinbestandteile schädigen können.

Proteine

Zur Proteinenmodifikation können neben den Produkte der Lipidperoxidation auch Sauerstoffradikale direkt und dabei hauptsächlich das Hydroxylradikal ($\text{OH}\bullet$) führen. Es kommt dabei zur Oxidation von Aminosäuren der Seitenketten, aber auch des Grundgerüsts, mit nachfolgender Protein-Fragmentierung und der Entstehung von intra- und intermolekularen cross-link-Verbindungen [23]. Dabei reagieren die reaktiven Sauerstoffspezies bevorzugt mit NH- und SH-Gruppen. Im Falle von Enzymen resultiert daraus häufig eine Aktivitätserniedrigung. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Enzyme, deren Aktivität an SH-Gruppen gebunden ist, wie unter anderem die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und die NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase, durch Sauerstoffradikale inaktiviert werden können [24].

DNA

Neben Strangbrüchen betreffen Schädigungen der DNA besonders häufig die Basen. Dort führen Sauerstoffradikale und deren Reaktionsprodukte zur Entstehung von Thymindimeren und 8-Hydroxydeoxyguanosinresten. Nachfolgende Basenfehlpaarungen führen, wenn nicht durch DNA-Reparaturenzyme behoben, zur Störung der Proteinbiosynthese. Durch das Auftreten derartiger Strukturveränderungen in der genetischen Substanz lässt sich die mutagene Wirkung von Sauerstoffradikalen erklären.

Kohlenhydrate

Es ist bekannt, dass Hyaluronsäure und Proteoglykane oxidativ geschädigt werden können und dabei depolymerisiert werden. Folge ist die Abnahme der Viskosität und damit ein verminderter Schmiereffekt der Synovialflüssigkeit. Die in der Synovialflüssigkeit vorkommende SOD schützt diese Verbindungen vor derartigen Schädigungen.

2.2.2. Das antioxidative System

Um den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies zu ermöglichen, benutzt der Organismus eine Anzahl sich ergänzender Mechanismen: das antioxidative System. Dazu gehören sowohl enzymatische als auch nichtenzymatische Antioxidantien, die prinzipiell auf drei Ebenen auf Sauerstoffradikale wirken können:

- (1) Verhinderung der Bildung,
- (2) Verhinderung der Wirkung auf Biomoleküle,
- (3) Beseitigung und Reparatur der durch sie verursachten Schäden.

Eine Auswahl wichtiger Antioxidantien ist in Tabelle 2 zusammengefasst:

System	Verbindung	Bemerkung
Enzymatisch	Glutathionperoxidase (GSH-Px)	Abbau von Peroxiden (mehrere Isoformen)
	Katalase	Abbau von H_2O_2
	Superoxiddismutase (SOD)	Abbau von $O_2^{\cdot-}$ (mehrere Isoformen)
Nichtenzymatisch	α -Tocopherol (Vitamin E)	unterbricht radikalische Kettenreaktionen
	β -Carotin	unterbricht radikalische Kettenreaktionen
	Ascorbinsäure (Vitamin C)	verschiedene antioxidative Funktionen
	Glutathion	verschiedene antioxidative Funktionen
	Harnsäure	Radikalfänger
Enzymatische	Glutathion-S-Transferase	Konjugationsenzyme
Hilfsmechanismen	Glucuronyltransferasen	
	Glutathionreduktase (GSSG-R)	Glutathionregenerierung
	Reparatursysteme	DNA-Reparatur Abbau oxidierter Proteine und Lipide

Tabelle 2: *Antioxidantien (modifiziert nach [25])*

2.2.2.1. Das enzymatische System

Tierische Zellen verfügen über antioxidative Enzyme, die entsprechend ihrer physiologischen Substrate in den verschiedenen Zellkompartimenten vorkommen.

(1) Glutathionperoxidase (GSH-Px)

Die GSH-Px ist ein Selenoenzym, dass in den verschiedenen Organen in unterschiedlichen Konzentrationen zu finden ist, wo es in der Regel zu 30% in den Mitochondrien und zu 70%

im Zytosol lokalisiert vorliegt [26]. Bei der zytosolischen GSH-Px unterscheidet man zwischen der Wasserstoffperoxid metabolisierenden GSH-Px und der Lipidhydroperoxide verstoffwechselnden GSH-Px, die membranassoziiert vorliegt. Die Aufgabe der GSH-Px besteht im Abbau von Hydroperoxiden zu den entsprechenden Alkoholen. Zu diesem Zweck wird Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel verwandt (Gleichung 14). Da Selen für den Erhalt der Enzymaktivität der GSH-Px unabdingbar ist, wird es im weiteren Sinne ebenfalls zu den Antioxidantien gezählt.



Unter physiologischen Bedingungen liegen das dabei gebildete Glutathiondisulfid (GSSG) und seine reduzierte Form GSH im Verhältnis 1:500 vor. Das gewährleistet das Enzym Glutathionreduktase (GSSG-R) durch die schnelle Regenerierung des Glutathions unter Verbrauch von Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH/H^+) aus dem Pentocephosphatweg [27] (Gleichung 15).



Dementsprechend wirkt sich eine Störung im NADP-Haushalt auch auf die Aktivität der GSH-Px aus.

(2) Superoxiddismutase (SOD)

Die enzymatische Funktion der SOD wurde erstmalig 1969 von Fridovich und McCord beschrieben [28]. Diese besteht in der Dismutation des Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (Gleichung 16).



Die SOD ist für die Entgiftung der in der Regel primär entstehenden Superoxidradikale zuständig und dementsprechend insbesondere an den Orten ihrer Bildung lokalisiert. Sie existiert in drei verschiedenen Isoformen, die sich im Metallion des katalytischen Zentrums unterscheiden:

- (1) die zytosolische CuZn-SOD
- (2) die in den Mitochondrien lokalisierte Mn-SOD
- (3) das Eisen-SOD-Isoenzym (Fe-SOD)

(3) Katalase

Das Hämenzym Katalase ist in erster Linie für die Entgiftung von H_2O_2 zu Wasser verantwortlich (siehe auch Abbildung 5). In den Peroxisomen lässt sich die höchste Katalaseaktivität nachweisen.

(5) Kooperation im enzymatischen System

Ein optimaler antioxidativer Schutz erfordert die enge Kooperation der enzymatischen Mechanismen. Abbildung 5 zeigt eine vereinfachte Zusammenstellung der sich ergänzenden antioxidativen Enzyme.

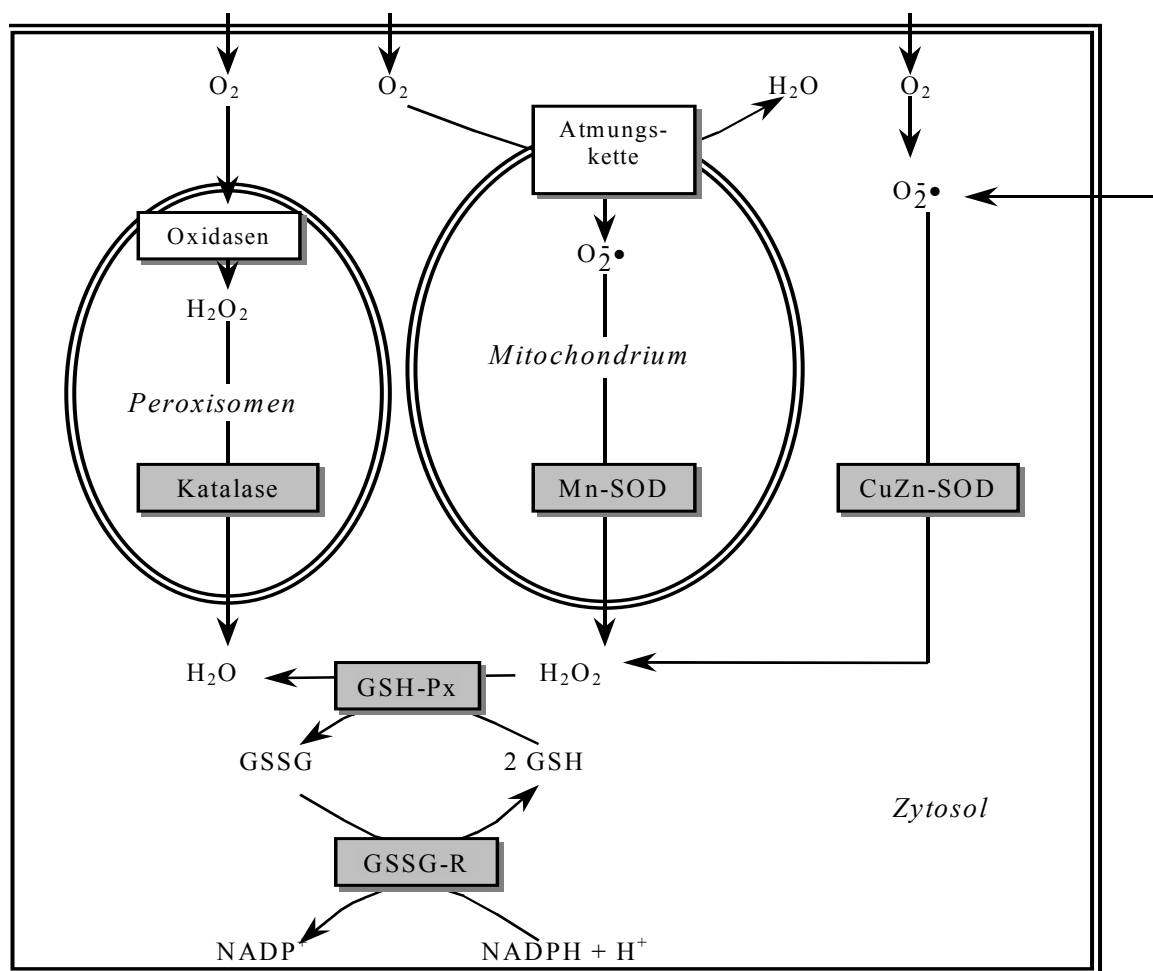


Abbildung 5: Abbauwege der reaktiven Sauerstoffspezies durch die antioxidativen Enzyme der Zelle

Am Beispiel der SOD kann die notwendige Kooperation verdeutlicht werden. Bekannt ist, dass die CuZn-SOD durch das eigene Reaktionsprodukt H_2O_2 oxidativ modifiziert und nachfolgend inhibiert wird. Ursache ist die leichte Oxidierbarkeit eines Histidins im aktiven Zentrum [29]. Die SOD-Aktivität kann damit nur aufrechterhalten werden, wenn das anfallende H_2O_2 durch Katalase und GSH-Px kontinuierlich metabolisiert wird.

2.2.2.2. *Das nichtenzymatische System*

(1) α -Tocopherol (Vitamin E)

In der Familie der E-Vitamine, einer Gruppe von Chromanderivaten, stellt das lipidlösliche α -Tocopherol den größten Anteil dar. In Membranen und Lipoproteinen wirkt es als „Kettenreaktionsbrecher“ und schützt auf diese Weise polyungesättigte Fettsäuren vor der Peroxidation. Dabei wirkt es synergistisch mit Ascorbinsäure. Durch die isoprenoide Seitenkette, die die Lipophilie vermittelt, wird der Einbau in Membranen ermöglicht. Dort können sie direkt am Ort der Lipidperoxidation ihre hohe Effektivität bei deren Hemmung entfalten. Bei der Reaktion mit Peroxyradikalen von Fettsäuren ($\text{LOO}\bullet$) wird eine am Chromanring gebundene Hydroxylgruppe oxidiert, wobei das Tocopherolradikal entsteht.

(2) Ascorbinsäure (Vitamin C)

Das hydrophile γ -Lacton Ascorbinsäure (Asc) wird von höheren Pflanzen und den meisten Tieren aus Glucose synthetisiert. Der Mensch und Primaten, sowie das Meerschweinchen sind zur Vitamin C-Synthese nicht fähig. Dadurch sind diese Spezies gezwungen die benötigte Menge mit der Nahrung aufzunehmen. Im Sauerstoffradikalstoffwechsel ist Vitamin C durch die Reduktion von Superoxidradikalen und Hydroxylradikalen von Bedeutung. Des Weiteren kann Ascorbinsäure Vitamin E regenerieren. Dieses Zusammenwirken wird in Abbildung 6 dargestellt. Den in hohen Dosen antioxidativen Eigenschaften des Vitamin C stehen die in niedrigen Konzentrationen prooxidativen Wirkungen entgegen. Diese fördern bei entsprechenden Bedingungen die Bildung von Sauerstoffradikalen und die Propagation der Lipidperoxidation.

(3) Glutathion (GSH)

Die Wirkung des hydrophilen Glutathion als Antioxidans basiert auf unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen besteht die Möglichkeit der direkten Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies, daneben dient es der GSH-Px als Co-Substrat und ist außerdem in der Lage oxidiertes α -Tocopherol zu regenerieren. In allen Fällen wird es dabei selbst zum Disulfid oxidiert. Ferner besteht die Möglichkeit der Anlagerung von GSH an proteingebundene SH-Gruppen unter Bildung eines gemischten Disulfids [30], wodurch die für die Enzymaktivität essentiellen Thiol-Gruppen wirkungsvoll vor Oxidation geschützt werden.

(4) Kooperation im nichtenzymatischen System

Wie im enzymatischen System sind kooperative Wirkungen entscheidend für einen optimalen antioxidativen Schutz. Die Kooperation der wichtigen Vertreter des nichtenzymatischen Systems Vitamin E, C und Glutathion ist in Abbildung 6 dargestellt.

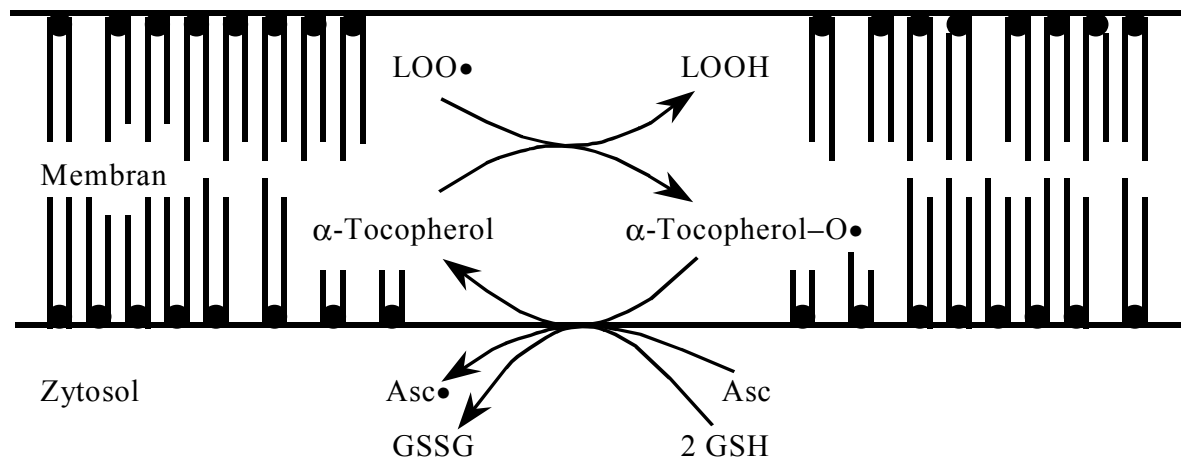


Abbildung 6: *Antioxidativer Synergismus von α-Tocopherol, Ascorbinsäure (Asc) und Glutathion (GSH)*

Das lipophile α-Tocopherol reagiert mit Peroxyradikalen von Fettsäuren (LOO•). Das entstehende Tocopherolradikal (α-Tocopherol-O•) wird von der hydrophilen Ascorbinsäure (Asc) oder Glutathion (GSH) reduziert, die dabei zum Ascorbinsäureradikal (Asc•) bzw. zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert werden.

2.2.3. Hitzeschockproteine (Hsp)

Viele Zellen besitzen durch konstitutive Stressproteine eine gewisse natürliche Toleranz gegenüber verschiedenartigen Noxen. Durch verstärkte Synthese dieser Hitzeschockproteine als Folge von Stresseinwirkung (unphysiologische Temperaturen, Sauerstoffmangel, chemische Agenzien oder parasitäre Infektionen) kann die Toleranzschwelle noch erhöht werden [31]. Die Hsp sind entsprechend ihren Molmassen klassifiziert worden in:

- (1) die Hsp90-Familie (Hsp100, Hsp90, Hsp86)
- (2) die Hsp70-Familie (Grp73, Hsp72, Hsp70, Hsp 68)
- (3) die Hsp60-Familie (Hsp60, TCP-1)
- (4) das Hsp40
- (5) die Familie der kleinen Stressproteine (Hsp25/28, αB-Crystallin)
- (6) das Hsp10 und
- (7) das Hsp8 (Ubiquitin).

In der Hsp70-Familie unterscheidet man zwischen dem konstitutiv vorhandenen Hsp70 und dem induzierbaren Hsp72, auch als Hsp70i bezeichnet. In der Familie der kleinen Stressproteine entspricht dem Hsp27 des Menschen das Hsp25 bei Ratte und Maus.

In der Zelle dienen die Stressproteine der Beseitigung molekularer Schäden und der Wiederherstellung der normalen Zellfunktion. Dabei bewirken einige (Hsp70, Hsp60/10-Komplex, Hsp25/28) als Chaperone die gerichtete Rückfaltung partiell denaturierter Proteine, ohne Teil des Produktes zu werden. Es ist nachgewiesen worden, dass die Hsp-Synthese durch Sauerstoffradikale direkt, aber auch durch Produkte radikalischer Reaktionen induziert wird [32]. Die die Induktion auslösenden Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSF) liegen bereits in inaktiver Form vor und binden unter Stress-Konditionen an eine spezifische DNA-Sequenz. Dadurch ist keine Proteinsynthese nötig um die Transkription der Hsp einzuleiten und verläuft dementsprechend schnell [33].

2.2.4. Sauerstoffradikale, Antioxidatives System, Stressproteine und Herzinsuffizienz

Es wurde gezeigt, dass Sauerstoffradikale in verschiedenen Modellen (Kaninchenseptum, isoliertes Rattenherz, Papillarmuskel) Reaktionen induzieren, die zur Einschränkung der Myokardkontraktion führen. Besonders sensitiv gegenüber oxidativem Stress sind die Membranstrukturen der Herzmuskelzelle. Beobachtet wurden oxidative Modulationen membranständiger Enzyme, veränderte Membranstrukturen oder sogar vollständige Membrandestruktion [24]. Nach Goldhaber und Weiss [34] beeinflussen Sauerstoffradikal-induzierte Reaktionen vor allem die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Störung der Ca^{2+} -Aufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR) als Folge der Hemmung der Phospholamban-abhängigen sarkolemmalen Ca^{2+}/Mg -ATPase und/oder verstärkten passiven Ca^{2+} -Einstrom. Sauerstoffradikale beeinflussen auch den Ca^{2+}/Na -Austausch, vermindern die Aktivität von Na/K-ATPase, sarkolemmaler Ca^{2+} -ATPase und myofibrillärer ATPase und führen zur Hemmung von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse. Thioloxydation und Lipidperoxydation führen nach vorübergehender Sensitivitätszunahme zum Funktionsverlust des sarkolemmalen β -Rezeptor-Adenylatcyclase-Systems [35]. Zur Einschränkung der Myokardfunktion können Sauerstoffradikale auch über die Freisetzung lysosomaler Enzyme und Inhibition von Transkriptions-/Translationsprozessen beitragen [36,37]. Dass Sauerstoffradikale auch direkt bei der durch RAS-Aktivierung induzierten Hypertrophie eine entscheidende Rolle spielen, wurde bereits im Kapitel 2.1.1 dargestellt. Tierexperimentell wurde gezeigt, dass

bei Katecholamin-, und Diabetes-induzierter Kardiomyopathie, bei der Kardiomyopathie ausgelöst durch das Zytostatikum Adriamycin [38] und bei der genetisch bedingten Kardiomyopathie des Syrischen Hamsters [39] Sauerstoffradikal-induzierte Schädigungsreaktionen (z.B. Lipidperoxidation) ablaufen.

Gupta und Singal [40] konnten in Tierversuchen an Ratten unter chronischer Druckbelastung durch „*aortic banding*“ zeigen, dass stabile Hypertrophie ohne wesentliche Anzeichen der Herzinsuffizienz mit einem Anstieg der antioxidativen Kapazität im Herzgewebe einhergeht. Ferner zeigten sie, dass dadurch hypertrophierte Herzen aufgrund des gesteigerten Antioxidantien-Gehalt weniger empfindlich gegenüber exogenem oxidativen Stress (z.B. Xanthin/Xanthinoxidase) sind. Auch hinsichtlich des Hypoxie-/Reoxygenierungsstress sind hypertrophierte Herzen mit gesteigertem antioxidativen Potential weniger sensibel [41,42].

Sowohl für die konstitutiv exprimierte Form des Hsp70 (Hsp70c) als auch für seine induzierbare Form (Hsp70i) ist die kardioprotektive Wirkung (Zunahme der Ischämie-Toleranz) nachgewiesen worden [43]. Das Hsp72 wird nur während der Phasen der akuten Adaptation induziert und ist zum Zeitpunkt der stabilen kardialen Funktion in vielen Fällen nicht nachweisbar. So tritt eine Erhöhung der Hsp72-Konzentration im Myokard beim Übergang zur Hypertrophie auf und fällt nach erfolgter Anpassung wieder ab [44]. Es hat bei höherer Konzentration einen nachgewiesenen protektiven Effekt gegenüber Myokardinfarzierung [45]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Hsp72 nicht direkt in Myozyten oder kardialen Neuronen lokalisiert ist, sondern zelltypspezifisch in den kleinen Blutgefäßen zwischen den Kardiomyozyten exprimiert wird [46]. Kardioprotektion kann auch von der Familie der kleinen Stressproteine erwartet werden, die in relativ großen Mengen in den I-Banden der Myozyten lokalisiert sind [47]. Vermutet wird, dass letztere Gruppe durch Verhinderung der Aggregation des Aktinfilaments irreversiblen Schäden am kontraktilem Apparat vorbeugt [48]. Bei erhöhter Produktion von Stressproteinen können diese auch als Autoantigene wirken, die die Zellen zu Zielen des Immunsystems machen [49], wodurch die Zellschädigung zunimmt.

2.2.5. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung

Aus der stimulierten isometrischen Kontraktion des Papillarmuskels im Gewebe-Bad lässt sich ein Mechanogramm aufzeichnen, welches, wie Abbildung 7 zeigt, die Kraftentwicklung im Verlauf der Zeit darstellt. Aus dieser Darstellung des Kraftsignals lässt sich die *peak force* (PF) und aus der 1. Ableitung die dF/dt_{\max} , die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit, und die dF/dt_{\min} , die maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit ableiten, welche die Kontraktions-

und Relaxationsfähigkeit des Myokards charakterisieren. Weitere errechnete Parameter sind die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit bezogen auf PF: $(dF/dt_{\max})/PF$ und die maximale Kraftabfallgeschwindigkeit auf die *peak force* normiert: $(dF/dt_{\min})/PF$.

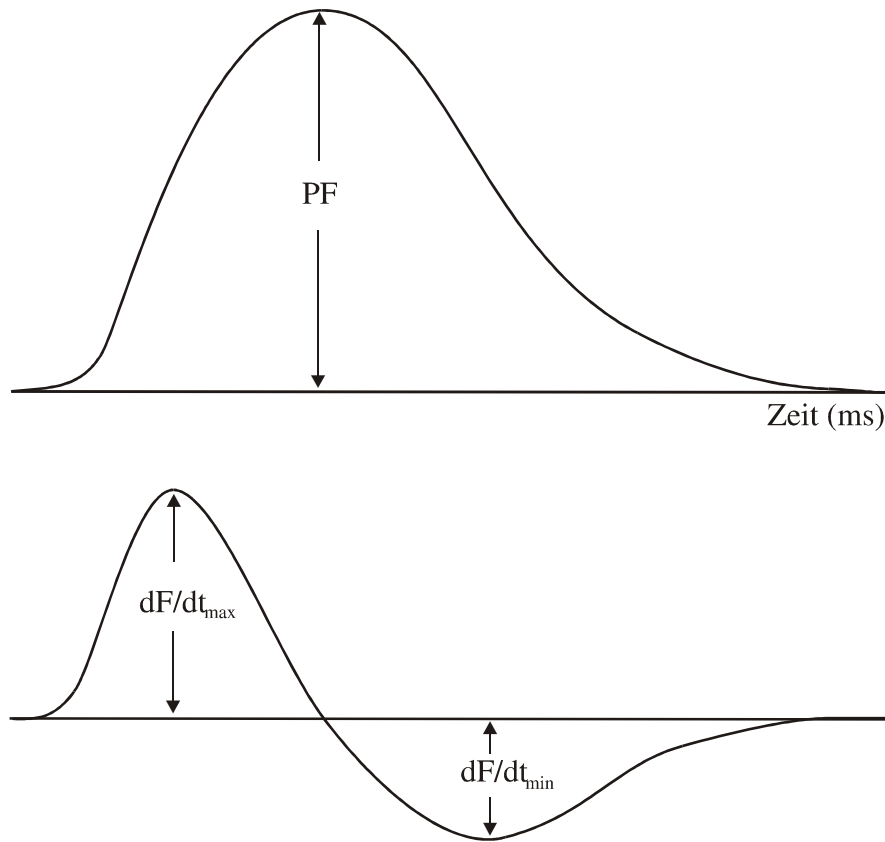


Abbildung 7: *Das Kraftsignal und dessen 1. Ableitung zur Charakterisierung der myokardialen Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit*

3. PROBLEMSTELLUNG

Singal und Kirshenbaum [50] haben die Hypothese aufgestellt, nach der im kompensierten Stadium der Herzinsuffizienz, trotz gesteigerter Sauerstoffradikalbildung, infolge der adaptiven Zunahme des enzymatischen antioxidativen Potentials das hypertrophierte Myokard weitgehend vor Sauerstoffradikal-induzierter Schädigungen geschützt ist. Erst nach Ausschöpfung dieses myokardialen "Selbstprotektionsmechanismus" trägt die dann verstärkt einsetzende Sauerstoffradikal-induzierte Myokardschädigung zum Übergang in die dekompenzierten Phase der Herzinsuffizienz bei. Detaillierte Vorstellungen zur Beteiligung von Stressproteinen an der Selbstprotektion des Myokards im Verlauf der Herzinsuffizienzentwicklung liegen nach unserer Kenntnis nicht vor.

Ziel der Arbeit war es:

1. am Rattenmodell der Hypertonie-bedingten Herzinsuffizienz und
2. am Rattenmodell der Myokardinfarkt-induzierten Herzinsuffizienz zu prüfen,

ob und in welcher Weise das Myokardremodeling, welches parallel durch die Hypertrophieparameter und die Veränderungen im CK-Isoenzym-System charakterisiert wurde, durch Änderungen im antioxidativen System und Hsp-System gekennzeichnet ist und ob dies eine Selbstprotektion des Myokard ermöglicht.

Nachfolgende Hypothesen wurden formuliert:

Hypothese 1

Beide Systeme tragen parallel zur Selbstprotektion des Myokards in der kompensierten Phase der Herzinsuffizienz bei. Dafür sprechen Untersuchungen, die nach Sauerstoffradikalbelastung eine parallele Induktion beider Systeme beschreiben [51,52].

Hypothese 2

Stressproteinsystem und enzymatisches antioxidatives System werden zur Selbstprotektion des Myokards zeitlich differenziert aktiviert. So ist bekannt, dass Stressproteine nach kurzzeitiger Myokardischämie exprimiert werden, ohne dass eine Aktivitätszunahme enzymatischer Antioxidantien beobachtet wurde [53]. Andererseits erfolgt die Syntheseinduktion von Hsp erst, wenn das antioxidative System als Folge langanhaltender oder exzessiv gesteigerter Bildung von Sauerstoffradikalen bereits überlastet bzw. geschädigt war [54,55].

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1. *Materialien*

4.1.1. Geräte

Analysenwaage, SBA 332; Scaltec, Heiligenstedt

Chromasorb W-AW; Serva, Heidelberg

Eppendorf K-Küvetten 4071/1; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Eppendorf-PCP 6121; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Eppendorf-Pipetten; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Fastblot B43; Biometra, Göttingen

HPLC-System; ChromSystems Instruments & Chemicals GmbH, München

Minishaker MS1; Ika-Works-INC

Multigel-Long; Biometra, Göttingen

Omni 2000 international; Digitana, Schweiz

pH-Meßgerät Delta 320; Mettler

Power Pack P25; Biometra, Göttingen

Rapid Elektrophorese; Helena Laboratories, Cleveland, Ohio

Spectrofluorometer RF-5001 PC; Shimadzu, Japan

Thermomixer 5433; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Ultraschallstab Labsonic 1510, B. Braun

UV-VIS Scanning Spectrophotometer UV-2101 PC; Shimadzu, Japan

4.1.2. Chemikalien

1-Butanol für die Spektroskopie; Merck, Darmstadt

2-Mercaptoaethanol; Ferrak, Berlin

2-Thiobarbitursäure; Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Acrylamid; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen

Color-Marker RPN 756; Amersham, Braunschweig

Colorsubstrat BCIP/NBT, S3771; Promega, Mannheim

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat; Merck, Darmstadt

Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA); Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen

Folin-Reagenz; Merck, Darmstadt

Gel-Blotting-Paper GB 004; Schleicher & Schuell, Dassel

Glycerin; Merck, Darmstadt

Glycin; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen

Kaliumhydrogenphosphat; Merck, Darmstadt

Kaliumnatriumtetrat-4-hydrat; VK Labor- und Feinchemikalien

Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat; VK Labor- und Feinchemikalien

Malondialdehyd-bis-(diethylacetal); Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Natriumcarbonat; VK Labor- und Feinchemikalien

Natriumcyanid; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen

Natriumdodecylsulfat (SDS); Merck, Darmstadt

Nitrocellulose Transfer Membran Protan BA83; Schleicher & Schuell, Dassel

N,N'-Methylen-bis-Acrylamid; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck, Darmstadt

Triton® X100; Merck, Darmstadt

Tween 20; Serva Feinbiochemica, Heidelberg

4.2. Methoden

4.2.1. 1.Tiermodell: Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie bei transgenen Ratten (TGR)

Bohlender et al. [56] gelang es am Max Delbrück Zentrum für molekulare Medizin in Berlin ein neues Rattenmodell der Hypertonie zu entwickeln. Dabei wurde durch Kreuzung ein doppelt transgener Rattenstamm erzeugt, der heterozygot für das komplette menschliche Angiotensinogen- und Renin-Gen ist. Dazu wurden männliche, normotensive Sprague-Dawley-Ratten, die homozygot für das humane Angiotensinogen-Gen waren mit weiblichen normotensiven TGR, homozygot für das menschliche Renin-Gen, gekreuzt. Die Nachkommen entwickelten einen Hypertonus mit systolischen Mitteldrücken um 220 mm Hg und starben unbehandelt im Mittel nach 55 Tagen. Bei den vorangegangenen Modellen produzierten die transgenen Ratten nur das menschliche Angiotensinogen. Da aber die Konversion von humanen Angiotensinogen zu Angiotensin I nur durch das humane Renin, nicht aber durch das Renin der Ratte erfolgen kann [57], war es nötig den Tieren zur Auslösung und Aufrechterhaltung eines Bluthochdrucks kontinuierlich menschliches Renin per Infusion zuzuführen. Derartiger Aufwand machte dieses Modell ungeeignet für das Studium der kardialen Hypertrophie, hypertensiven Nephrosklerose und anderen Folgen. Mit der oben beschriebenen Methode gelang nun die Erzeugung eines neuen Stammes, bei dem die Ratten alle Komponenten des humanen Renin-Angiotensin-Systems zur Produktion von AngII und damit zur Entwicklung eines spontanen Hypertonus in sich tragen. Die Tiere erhielten über den gesamten Versuchszeitraum Standard-Pelletfutter und Wasser ad libidum.

Für die Untersuchungen des Sauerstoffradikalmetabolismus und der Creatinkinase wurden uns 14 Herzproben der doppelt transgenen Sprague-Dawley-Ratten (TGR) überlassen. Als Kontrollgruppe dienten 14 altersentsprechende nicht transgene Kontrolltiere, ebenfalls Sprague-Dawley-Ratten („wild type“ - WT).

4.2.2. 2.Tiermodell: Myokardinfarkt-induzierte Herzhypertrophie bei Ratten^{*}

Der Myokardinfarkt wurde entsprechend einer Vorschrift von Johns und Olson [58] durch die Ligation der Arteria coronaria sinistra verursacht. Dazu wurden die 6 Wochen alten Wistar Rat-

^{*} Operationen: AG Dr. Stauß; Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der HU-Berlin

ten mit einem Gewicht von 250 bis 280 g durch intraperitoneale Injektion von 75 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketanest[®], Sanovi-Ceva) mit 7,5 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun[®], Bayer) anästhesiert. Anschließend wurden sie intubiert und mit Luft ventiliert. Nach Thorakotomie und Freilegung des Herzens wurde die linke Koronararterie zwischen der Pulmonalarterie und dem linken Atrium ligiert. Die Okklusion wurde durch die regionale Zyanose des Myokards und die begleitenden Elevation des ST-Segments im EKG gesichert. Die Kontrollgruppe (Sham) wurde der identischen chirurgischen Prozedur unterzogen mit dem Unterschied, dass der Faden neben der Arterie geknüpft wurde. Die Tiere erhielten ebenfalls über den Versuchszeitraum Standard-Pelletfutter und Wasser ad libidum. Jede der beiden Gruppen MI (Myokardinfarkt) und Sham wurden dann randomisiert auf jeweils vier Untergruppen verteilt. Für vier unterschiedliche postoperative Zeitspannen (0, 3, 6, 9 Wochen) entstanden so vier mal zwei Tiergruppen. Für den Zeitpunkt 0 Wochen wurden die Herzen nach 14-16 Stunden nach Operation entnommen.

4.2.3. Proben- und Plasmagewinnung

Nach Anästhesie der Ratten durch Äther wurde der Thorax geöffnet und durch Herzpunktion das Blut gewonnen. Aus diesem wurde nachfolgend Plasma abzentrifugiert, welches bei -80°C bis zur Messung gelagert wurde. Das Herz wurde entnommen und gewogen, ebenso wie nach erfolgter Präparation die Vorhöfe, Ventrikel und Papillarmuskeln. Für die biochemische Analytik wurden anschließend jeweils rund 50 mg Gewebe aus dem rechten und linken Ventrikel (nicht infarziertes Areal), portioniert und ebenso wie ein separierter Papillarmuskel bis zur Analytik in flüssigem Stickstoff gelagert. Aufgrund der geringen Materialmenge beschränkten wir uns bei den biochemischen Untersuchungen des Papillarmuskels im ersten Tiermodell auf die GSH-Px und die Hsp-Analytik. Im zweiten Modell wurde im Papillarmuskel nur der Hsp-Status bestimmt. Ein zweiter Papillarmuskel wurde unmittelbar nach der Isolierung den Messungen zur Charakterisierung der Herzleistung zugeführt.

4.2.4. Aufarbeitung der Gewebeproben für die biochemischen Untersuchungen

Von den tiefgekühlten Gewebeproben wurden jeweils 30 mg in gefrorenem Zustand eingewogen und in 1200 μl 0,9 %iger NaCl-Lösung mit dem Messerhomogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Dabei wurde nach folgendem Schema verfahren: 4 mal 15s Homogenisierung mit jeweils 10 s Pause. Anschließend wurden die Proben portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Aufarbeitung der Gewebe für die Bestimmung der Stressproteine ist in Kapitel 4.2.11. beschrieben.

4.2.5. Aktivitätsbestimmung der Creatinkinase

Grundlage für die Bestimmung der CK-Aktivität bildet ein gekoppelter optischer Test, mit dem alle CK-Isoenzyme erfasst werden. Die Creatinkinase katalysiert den Transfer des energiereichen Phosphatrests vom Creatinphosphat auf ADP (Gleichung 17). Anschließend wird Glukose mit ATP in Gegenwart von Hexokinase (HK) zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert (Gleichung 18). Dieses reagiert mit NADP^+ unter Bildung von Gluconolacton-6-Phosphat und NADPH_2 , katalysiert durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) (Gleichung 19). Die CK-Aktivität ist proportional zu der pro Zeiteinheit gebildeten Menge NADPH_2 .



Es wurde der Test-Kit *CK-NAC opt.* der Firma Lehmann Labor und Technik, Berlin verwandt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3 aufgeführt ist.

Inhalt	Konzentration im Test
1. Enzyme	
Hexokinase	3,5 U/ml
G6P-DH	2,0 U/ml
ADP	2 mmol/l
AMP	5 mmol/l
Diadenosinpentaphosphat	10 $\mu\text{mol/l}$
NADP	2 mmol/l
Creatinphosphat	30 mmol/l
N-Acetylcystein	20 mmol/l
2. Puffer	
Imidazol-Puffer	100 mmol/l, pH = 6,7
Glukose	20 mmol/l
Mg-Acetat	10 mmol/l
EDTA	2 mmol/l

Tabelle 3: Zusammensetzung des CK- Test-Kits der Firma Lehmann

Die Homogenate wurden vor der Messung für 3 s mit dem Ultraschallstab rehomogenisiert und aus Stabilitätsgründen ebenso wie die Reagenzien über die Zeit der Messungen auf Eis gelagert. Die Proben wurden im Verhältnis 1:20 mit einem Phosphatpuffer verdünnt, um im zuvor be-

stimmten linearen Bereich zu messen. 500 µl der Reagenzlösung wurden in einer Küvette bei 37° C vortemperierte und anschließend 20 µl der verdünnten Probenlösung dazugegeben. Der Ansatz wurde 10s mit dem Thermomixer gerüttelt und die Küvette in die Messkammer des Eppendorf-PCP 6121 überführt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei folgenden Parametern:

Wellenlänge:	334 nm	Schichtdicke der Küvette:	1 cm
Messtemperatur:	37 °C	Messzeit:	1 min

Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes: $\Delta E = \epsilon \cdot c \cdot d$, wobei ΔE die Extinktionsänderung, c die Konzentration, d die Schichtdicke der Küvette und ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten bezeichnet. Die Aktivität der CK wurde zum Vergleich der Ergebnisse auf den Eiweißgehalt bezogen in U/mg Protein angegeben.

4.2.6. Elektrophoretische Bestimmung des Creatinkinase-Isoenzyimmusters

Die Trennung der Isoenzyme erfolgt entsprechend ihrer elektrophoretischen Wanderungsfähigkeit im Agarosegel, bestimmt durch ihre isoelektrischen Punkte. Dabei wandert die BB-Fraktion am weitesten anodisch gefolgt von der MB-Fraktion; CK-MM bleibt nahezu an der Auftragstelle und die CK-Mi bewegt sich zur Katode hin. Nach Inkubation des Gels mit einem fluoreszierenden Farbstoff wird das gebildete und in den Banden lokalisierte NADPH₂ sichtbar gemacht und auf diese Weise die CK-Muster quantitativ densitometrisch auswertbar. Zur Bestimmung des CK-Isoenzyimmusters wurde die Rapid-Elektrophorese-Technik der Firma *Helena Laboratories* genutzt. Die Zusammensetzung des CK-Isoformen-Kit ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Inhalt	Konzentration im Test
Hexokinase	9000 U/l
G6P-DH	7500 U/l
ADP	12 mmol/l
AMP	15 mmol/l
NAD	6 mmol/l
Creatinphosphat	90 mmol/l
N-Acetylcystein	60 mmol/l
D-Glukose	60 mmol/l
Mg-Acetat	60 mmol/l

Tabelle 4: Zusammensetzung des CK-Isoformenkit der Firma *Helena Laboratories*

Das Gerät wurde mit folgenden Parametern programmiert:

Probenauftragsvolumen:	1 µl	Spannung:	1400 Volt
Elektrophoresedauer:	10 min	Temperatur:	15° C

4.2.7. Aktivitätsbestimmung der Glutathionperoxidase (GSH-Px)

Die auf der Basis eines gekoppelten optischen Test beruhende Aktivitätsbestimmung der GSH-Px wurde erstmalig von Paglia und Valentine beschrieben [59]. Glutathionperoxidase katalysiert die Oxidation von Glutathion (Gleichung 20). In Gegenwart von Glutathionreduktase (GSSG-R) und NADPH wird das oxidierte Glutathiondisulfid (GSSG) wieder zu Glutathion reduziert, wobei gleichzeitig das NADPH zu NADP^+ oxidiert wird (Gleichung 21). Gemessen wird die Abnahme der NADPH-Extinktion bei 340 nm.



Zur GSH-Px-Bestimmung wurde ein Test-Kit der Firma *Randox Laboratories* genutzt, der auf der Basis des obigen Reaktionsprinzips arbeitet. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des Tests. Nach dem Rehomogenisieren wurden die Proben, sowie die Reagenzien über den Zeitraum der Messungen auf Eis gelagert und entsprechend dem folgendem Pipettierschema der Analytik zugeführt.

Lösungen	Leerwert (in µl)	Probe (in µl)
unverdünnte Probe	-	10
aqua dest	50	40
Reagenz	500	500
Cumenhydroperoxid	20	20

Zur Aktivitätsbestimmung wurden folgende Parameter gewählt:

Wellenlänge:	340 nm	Schichtdicke der Küvette:	0,5 cm
Messtemperatur:	37 °C	Messzeit:	3,5 min

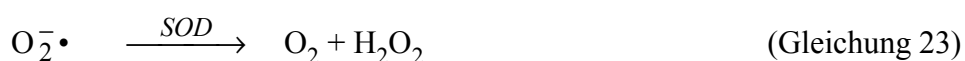
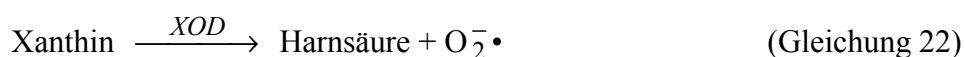
Die Glutathionperoxidase-Aktivität erhält man durch Abzug der nichtenzymatischen NADPH-Abnahme (Leerwert) von der Gesamtaktivität. Somit ergibt sich, dass 1 Unit genau der Menge GSH-Px entspricht, die notwendig ist um 1 µmol GSH bei pH 7,4 und 37 °C innerhalb einer Minute zu oxidieren. Die gemessenen Aktivitäten sind ebenfalls in U/mg Protein angegeben.

Inhalt	Konzentration im Test
1. Reagenz	
Glutathion	4,0 mmol/l
Glutathionreduktase	$\geq 0,5$ U/l
NADPH	0,28 mmol/l
2. Puffer	
Phosphatpuffer	0,05 mmol/l, pH = 7,2
EDTA	4,3 mmol/l
3. Cumenhydroperoxid	0,18 U/l
4. Verdünnungslösung	

Tabelle 5: *Zusammensetzung des GSH-Px-Test-Kits der Firma Randox-Laboratories*

4.2.8. Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase (SOD)

Die SOD-Bestimmung beruht auf einer Vorschrift von Beauchamp und Fridovich [60]. Dabei werden mit Xanthin als Substrat durch Xanthinoxidase (XOD) Superoxidradikale produziert (Gleichung 22). In einer Folgeraktion wird durch die entstandenen Superoxidradikale ein roter Formazan-Farbstoff (I.N.T.) gebildet. Andererseits können die Superoxidradikale auch über die Dismutationsreaktion der SOD zu molekularem Sauerstoff und H_2O_2 metabolisiert werden (Gleichung 23). Die Enzymaktivität wird somit über die Hemmung der Formazan-Farbstoffbildung bestimmt.



Zur SOD-Aktivitätsbestimmung wurde ein dieses Reaktionsprinzip nutzender Test-Kit der Firma *Randox Laboratories* genutzt. Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung des Test-Kits.

Inhalt	Konzentration im Test
1. Substrat-Mix	
Xanthin	0,05 mmol/l
I.N.T.	0,025 mmol/l
2. Puffer	
CAPS	40 mmol/l, pH = 10,2
EDTA	0,94 mmol/l
3. Xanthinoxidase	80 U/l

Tabelle 6: *Zusammensetzung des SOD-Test-Kits der Firma Randox-Laboratories*

Die zu messenden Gewebekomogenate wurden wie oben beschrieben rehomogenisiert und zusammen mit den Reagenzien für die gesamte Dauer der Messung auf Eis gelagert. Da diese Methode indirekt ist, d.h. auf der Bildung von $O_2^{\bullet -}$ in einer vorgeschalteten Generatorreaktion beruht, besteht nur in einem bestimmten Bereich ein lineares Verhältnis zwischen Hemmung der Indikatorreaktion und Aktivität der SOD. In vorangegangenen Studien konnte für diese Methode eine lineare Beziehung im Bereich zwischen 24 und 55% Hemmung ermittelt werden. Die Verdünnung des Probenvolumens in der Küvette mit aqua dest wurde deshalb so angepasst, dass die gemessene Hemmung in diesem Bereich lag. Das Messen der Mn-SOD erfolgte aus dem reinen Herzhomogenat, während es für die Gesamt-SOD notwendig war, im Verhältnis 1:100 zu verdünnen.

Das Pipettierschema ist der folgenden Tabelle zu entnehmen (Angaben in μl):

Lösungen	Leerwert	Gesamt-SOD	Mn-SOD
Probe	-	x (< 100)	x (< 50)
aqua dest	100	100-x	50-x
Mixsubstrat	340	340	340
XOD	50	50	50
NaCN (0,02 M)	-	-	50

Nach Mixen der Lösungen in der Küvette wurde bei folgenden Parametern gemessen:

Wellenlänge:	505 nm	Schichtdicke der Küvette:	0,5 cm
Messtemperatur:	37 °C	Messzeit:	3,5 min

Gemessen wurde die zeitabhängigen Zunahme der Farbstoffintensität in $\Delta E/\text{min}$. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Hemmung der Farbstoffbildung durch die SOD wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \left(\frac{\Delta E / \text{min}_{\text{Probe}} \cdot 100}{\Delta E / \text{min}_{\text{Leerwert}}} \right)$$

Zur Angabe der Aktivität in Units wurde eine 50%ige Hemmung der Indikatorreaktion definiert als 1 Unit/ml. In der Literatur angegebene SOD-Aktivitäten basieren neben dieser auch auf anderen Definitionen. Diese Unterschiede führen dazu, dass publizierte SOD-Werte nicht zwangsläufig miteinander verglichen werden können.

4.2.8.1. Differenzierung der SOD-Isoenzyme

Durch Zugabe von Zyanid wird ein Teil der SOD-Aktivität gehemmt. In ausreichender Konzentration zugeführtes Zyanid vermag nur das Kupfer-Zink-Isoenzym zu blockieren, während die Mangan enthaltende SOD unbeeinflusst bleibt. Da in den Gewebehomogenaten nur ein relativ geringer Anteil des Proteingehalts auf die SOD entfällt und auch andere Proteine durch Bindung die Konzentration freier CN-Moleküle im Test verringern, ist es von Bedeutung die notwendige Menge CN auszutitrieren, die eine selektive Hemmung der CuZn-SOD gewährleistet. In Abbildung 8 wird der Zusammenhang zwischen der SOD-Aktivität und der CN-Konzentration dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass im Rattenherzhomogenat erst ab einer Konzentration von $\geq 1,0$ mmol/l im Testansatz eine ausreichende Hemmung der CuZn-SOD erreicht wird. Allerdings ist auch zu erkennen, dass es ab Konzentrationen $\geq 2,0$ mmol/l zu einem weiteren Aktivitätsverlust kommt, der sich durch die Hemmung von im Test-Kit vorhandenen Komponenten, am ehesten der Xanthinoxidase, erklären lässt. Diese Vermutung ließ sich durch das Verhalten des Leerwertes bei Zugabe steigender CN-Konzentrationen bestätigen. Abbildung 9 zeigt die Verminderung der Formazan-Farbstoffbildung und damit auch der Sauerstoffradikalgenerierung ab 2,0 mmol/l NaCN unter diesen Bedingungen. Folglich wurde zur Bestimmung der Mn-SOD die Hemmung der Farbstoffbildung in Anwesenheit von 1,0 mmol/l NaCN im Testansatz gemessen und die Konzentration analog der Gesamt-SOD berechnet. Durch Subtraktion der Mn-SOD von der Gesamt-SOD lässt sich nachfolgend die CuZn-SOD berechnen. Die Aktivität der SOD und ihrer Isoenzyme wurde zum Vergleich der Ergebnisse ebenfalls auf den Eiweißgehalt bezogen in U/mg Protein angegeben.

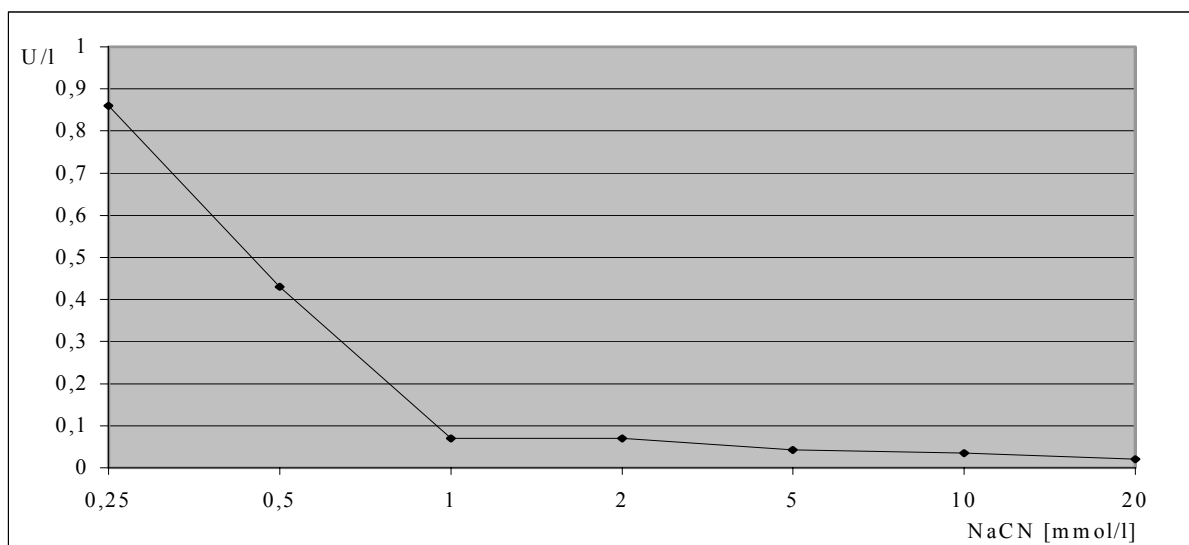


Abbildung 8: NaCN-Wirkung auf die SOD-Aktivität im Rattenherzhomogenat (Gesamt-SOD = 1,34 U/l)

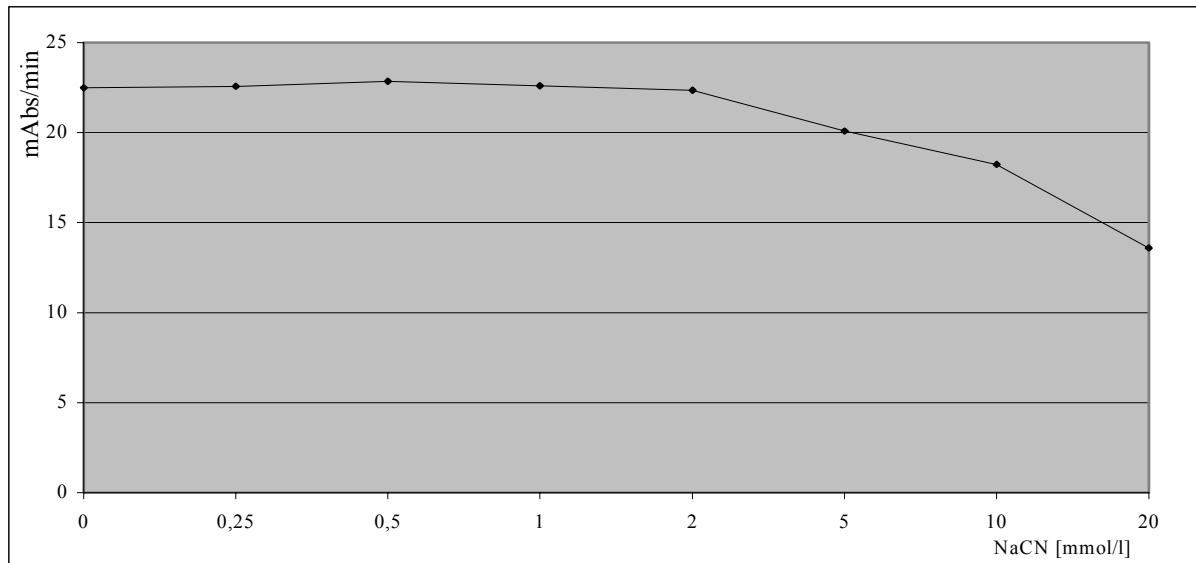


Abbildung 9: *NaCN-Wirkung auf den Leerwert bei der SOD-Bestimmung*

4.2.9. Bestimmung der Lipidperoxid-Konzentration

Zur Bestimmung der Lipidperoxid-Konzentration in den Herzhomogenaten wurde die von Ohkawa et al. [61] entwickelte Methode genutzt. Wie in Kapitel 2.2.1.3. beschrieben, entsteht bei der Lipidperoxidation Malondialdehyd (MDA). Mit Thiobarbitursäure (TBA) bildet MDA einen roten Polymethinfarbstoff, der fluorimetrisch gemessen werden kann. Unter den Testbedingungen (niedriger pH-Wert, hohe Temperatur) reagieren auch Vorstufen der MDA-Bildung mit TBA. Die Reaktionsprodukte werden demnach als Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) bezeichnet. Tabelle 7 zeigt die genutzten Chemikalien und ihre Konzentrationen im Test.

Lösung	Konzentration
NaCl	0,154 mol/l
20%ige Essigsäure	mit NaOH auf pH 3,5 eingestellt
Natriumdodecylphosphat (SDS)	0,28 mol/l
2-Thiobarbitursäure (TBA)	0,049 mol/l
n-Butanol	-

Tabelle 7: *Testzusammensetzung für die Bestimmung der TBARS*

Die Leerwerte, Eichreihen und Proben wurde anhand folgendem Pipettierschema in Reagenzgläsern gemischt:

Lösungen	Leerwert (in µl)	Eichreihe (in µl)	Probe (in µl)
unverdünnte Probe	-	-	x
MDA-Lösung	-	5;10;15;20;30	-
aqua dest	150	150	150-x
Acetatpuffer (pH 7,4)	300	300	300
SDS	40	40	40
TBA	300	300	300

Die Testansätze wurden für 60 min bei 90 °C inkubiert und nachfolgend im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 200 µl aqua dest und 1000 µl Butanol zugegeben und für 20 min geschüttelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min konnte die Messung der Fluoreszenz in der überstehenden organischen Phase bei folgenden Parametern erfolgen:

Wellenlänge Exzitation:	515 nm	Temperatur:	25 °C
Emission:	553 nm	Schichtdicke der Küvette:	1 cm

Die Berechnung der Konzentration an TBARS-Konzentrationen erfolgte nach Subtraktion des Leerwertes anhand der Eichreihe mit Standardkonzentrationen an MDA, gebildet aus 1,1,3,3-Tetraethoxypropan in nmol/mg Protein.

4.2.10. Bestimmung der Vitamin E-Konzentration im Serum

Zur Analyse des Serum-Vitamin E-Gehalts wurde ein in der Labor-Routine gebräuchliches *high-performance-liquid-chromatographie*-(HPLC)-System der Firma *ChromSystems* verwandt.

4.2.11. Bestimmung von Hsp25 und Hsp72

Die Bestimmung der Hsp25- und 72-Konzentration im Ventrikelgewebe und im Papillarmuskel erfolgte nach einer Vorschrift von Lutsch et al. [62].

Probenaufbereitung

Zur Probenaufbereitung wurden 5-10 mg Gewebe mit 100µl Puffer (pH 6,8: 62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% Glycerin) inkubiert und anschließend nach Zugabe von weiteren 50µl Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde in Eppendorfröhrchen überführt und 5 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Der entstandene klare Überstand wird für die Bestimmung abgenommen. Zunächst erfolgte die Proteinbestimmung mittels Bio-Rad DC Protein Assay in jedem Homo-

genat. Nachfolgend wird das Homogenat mit β -Mercaptoethanol auf eine Endkonzentration von 5-6% und mit Bromphenolblau auf 0,001% eingestellt. Durch 3minütiges Kochen im Wasserbad werden die Proteine denaturiert und durch das Bromphenolblau markiert. 100 μ g Protein werden von jeder Probe der nachfolgenden Elektrophorese zugeführt.

Elektrophorese

Zum Auftrennen der Proteine wird ein Gradientengel aus 7,5% Acrylamid/0,2% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid und 15% Acrylamid/0,6% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid hergestellt. Weiterhin ist zur Verbesserung der Banden-Auflösung die Herstellung eines großporigen Sammelgels aus 3% Acrylamid/0,08% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid nötig. Als Laufzeitende der Elektrophorese im Puffer (pH 6,8: 25mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 192mM Glycin, 0,1% SDS) wurde das Erreichen der Gelunterkante durch das Bromphenolblau festgelegt.

Western-Blotting

Durch das anschließende Semi-Dry-Elektro-Blotting bei 0.8 mA/cm² erfolgt ein Überführung der aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulose mittels eines Transferpuffers (pH 8,3: 25mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 150mM Glycin, 10% Methanol). Danach wurde mit einer 5%igen Magermilchlösung in TBS-Puffer (pH 7,3) + 0,05% Tween 20 geblockt (60'), um freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose mit Protein zu besetzen.

Quantitativer Nachweis

Der Antigen-spezifische erste Antikörper bindet an das Hsp-Protein und wird seinerseits durch den spezifischen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Durch das Enzym Alkalische Phosphatase wird nachfolgend ein Colorsubstrat unter Farbstoffbildung umgesetzt, was die Banden anfärbt und eine quantitative densitometrische Auswertung der Produktmenge ermöglicht. Nachfolgend die benutzten Antikörper im Einzelnen:

<u>Hsp25:</u>	1. Antikörper:	Anti-Hsp25 Kaninchen-Antikörper	Berlin Buch
	2. Antikörper:	Anti-Rabbit IgG(Fc), AP Conjugate	Promega, Mannheim (S 3731)
<u>Hsp72:</u>	1. Antikörper:	Anti-Hsp72 Mouse IgG	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH (H 5147)
	2. Antikörper:	Anti-Mouse IgG(H+L); AP Conjugate	Promega, Mannheim (S 3721)

Aufgrund der Blotting-Technik mit unterschiedlichen Fixierungszeiten werden anstelle der absoluten Konzentrationen die Hsp-Konzentrationen in Prozent angegeben. Dafür wurden in jedem Blot die Kontrollen und Experiment-Tiere in gleicher Anzahl kombiniert. Die Konzentration der TGR wurde bezogen auf die Konzentration der WT im jeweiligen Blot angegeben, deren Mittelwert als 100% angenommen wird.

4.2.12. Proteinbestimmung

Die Analyse des Proteingehaltes erfolgte nach Lowry et al. [63].

Nach gründlicher Mischung und 10minütiger Inkubation, der im nachfolgendem Pipettierschema zusammengefassten Reagenzien, mussten ebenso wie der Eichreihe mit humanem Serumalbumin (0,39 mg/ml) noch 150µl Folin-Lösung hinzugefügt und erneut für 60 min inkubiert werden. Die Messung der Extinktion erfolgte dann am UV-VIS Scanning Spektrophotometer bei 750 nm. Der Nullabgleich erfolgte gegen den Leerwert.

Lösungen	Leerwert (in µl)	Eichreihe (in µl)	Probe (in µl)
unverdünnte Probe	-	-	20
Serumalbuminlösung	-	x	-
aqua dest	200	200-x	180
NaOH (1N)	20	20	20
Gebrauchslösung	1500	1500	1500

4.2.13. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung^{*}

Um Aussagen zur funktionellen Leistung des Myokards unter Hypoxie/Reoxygenierungsstress machen zu können, wurden - wie in Kapitel 2.2.5. - beschrieben, isometrischen Kontraktionen der Papillarmuskeln im Gewebe-Bad ausgelöst. Diese Blutersatzlösung war folgendermaßen zusammengesetzt (Angaben in mmol/l): NaCl 140,0; KCl 5,0; CaCl₂ 0,75; MgCl₂ 1,1; Tris/HCl 10,0; D-Glukose 11,1; pH 7,4. Zur Simulation der Hypoxie wurde das Gewebabad mit Stickstoff und im Fall der Reoxygenierung mit Sauerstoff durchströmt.

^{*} AG Prof. Dr. Scholz; Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der HU-Berlin

4.2.14. Statistische Auswertung

Die Verwaltung und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Nutzung des Computerprogramms *Excel 97*. Zur statistische Auswertung wurde die Software *SPSS* unter Anwendung des t-Tests für abhängige und unabhängige Stichproben genutzt. Für die Mehrfachvergleiche 0,3,6,9 Wo nach MI wurde der ANOVA-Test durchgeführt ebenfalls unter Nutzung des Computerprogramm *SPSS*.

Alle angeführten und dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM = Standard error of mean) angegeben.

5. ERGEBNISSE

5.1. Ergebnisse 1. Tiermodell: Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie bei transgenen Ratten (TGR)

5.1.1. Körpergewicht, Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex

Zur Beurteilung des Hypertrophiegrades wurden die Körper- und Ventrikelgewichte der Tiere bestimmt und die Hypertrophieindizes berechnet. Das Körpergewicht (KG) der TGR war verglichen mit der Kontrollgruppe um 14% ($188,29 \pm 9,15$ vs. $219,21 \pm 10,88$ g) niedriger (Abbildung 10), das Gesamt-Ventrikelgewicht (VG) um 16% ($0,88 \pm 0,03$ vs. $0,76 \pm 0,04$ g) größer (Abbildung 11).

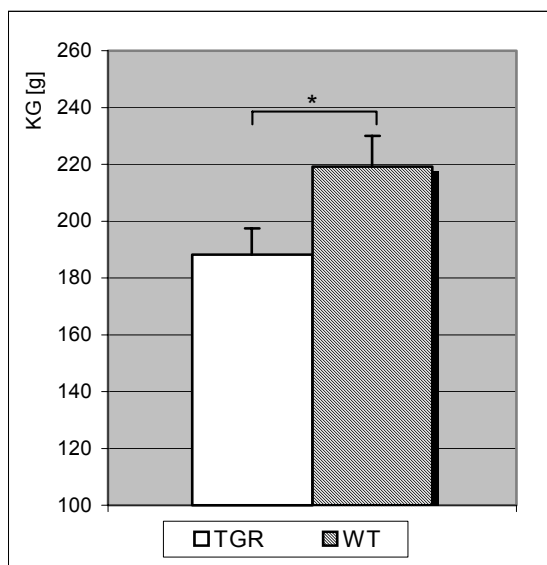


Abbildung 10: Körpergewichte (KG) der TGR und WT. * $p < 0,05$

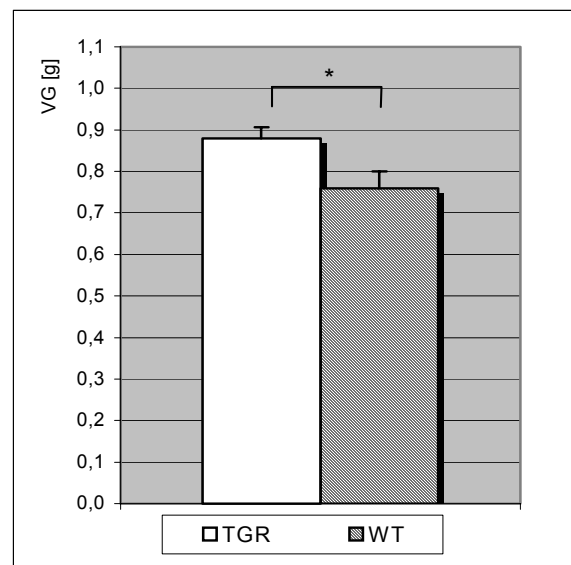


Abbildung 11: Gesamt-Ventrikelgewichte (VG) der TGR und WT. * $p < 0,05$

Abbildung 12 zeigt, dass die Erhöhung des VG bei den TGR aus der Zunahme des links-ventrikulären Gewichts (LVG) resultiert ($0,72 \pm 0,02$ vs. $0,60 \pm 0,03$ g). Hinsichtlich der Gewichte des rechten Ventrikels (RVG) wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden ($0,16 \pm 0,01$ vs. $0,16 \pm 0,01$ g).

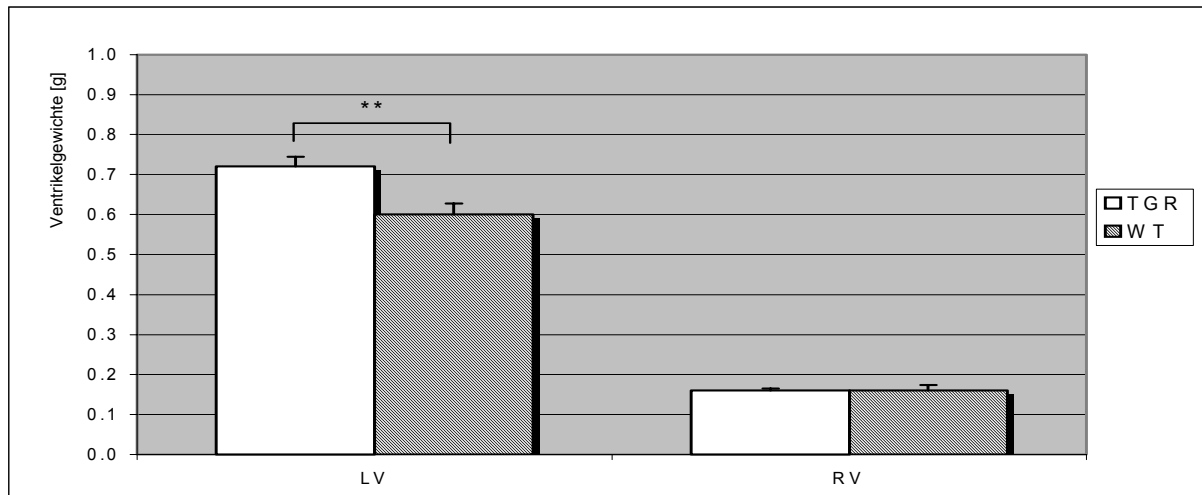


Abbildung 12: Gewichte des linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels der TGR und WT. $**p < 0,01$

Abbildung 13 stellt die Hypertrophieindizes zusammen. Das relative, auf das Körpergewicht bezogene Ventrikelgewicht (VG/KG x 1000) war bei den TGR vs. WT um 37% erhöht ($4,74 \pm 0,18$ vs. $3,47 \pm 0,06$). Der Quotient LVG/KG x 1000 war ebenfalls höher als in der Kontrollgruppe ($3,88 \pm 0,15$ vs. $2,73 \pm 0,06$). Beim Quotient RVG/KG x 1000 fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Experiment- und Kontrollgruppe ($0,86 \pm 0,04$ vs. $0,74 \pm 0,03$).

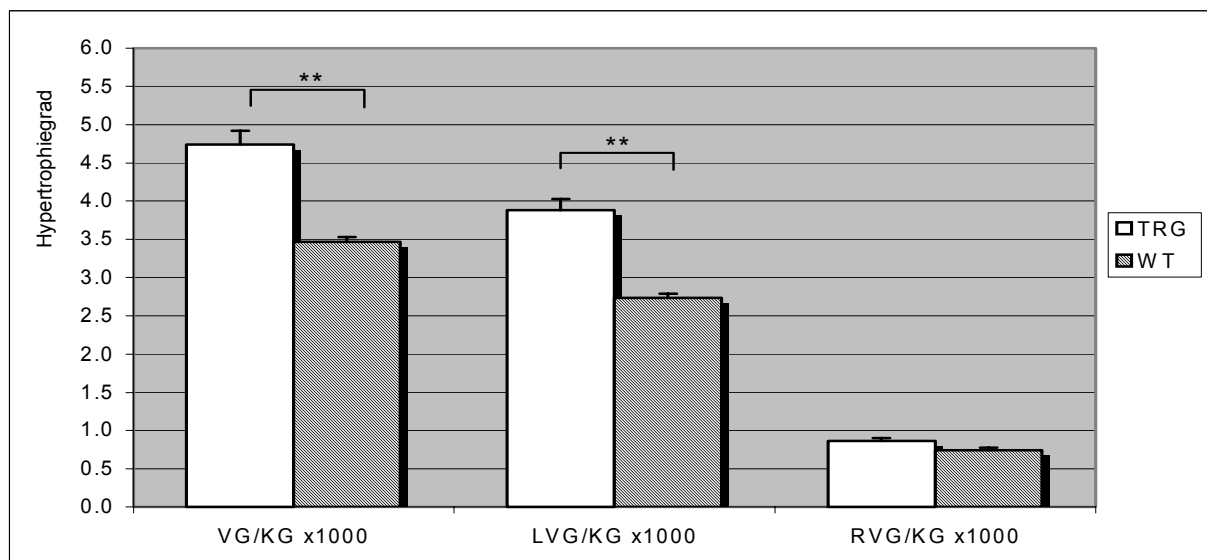


Abbildung 13: Ventrikel/Körpergewichtquotienten von TGR und WT. $**p < 0,01$ (Abkürzungen im Text erläutert)

5.1.2. Myokardialer CK-Gehalt und CK-Isoenzymmuster

In beiden Herzkammern der TGR lag der Mittelwert der Gesamt-CK-Aktivität verglichen mit der Kontrollgruppe niedriger; im linken Ventrikel: $14,27 \pm 0,72$ vs. $16,23 \pm 0,53$ U/g Protein, im rechten: $15,37 \pm 0,69$ vs. $16,48 \pm 0,61$ U/g Protein. Signifikant war der Unterschied nur im linken Ventrikel (Abbildung 14). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Creatinkinase in ihre Isoenzyme konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Im linken Ventrikel der TGR verglichen mit den Kontrollherzen wurde eine signifikante Erhöhung der CK-MB ($16,54 \pm 0,61$ vs. $14,03 \pm 0,51\%$) und CK-BB ($1,50 \pm 0,11$ vs. $1,16 \pm 0,09\%$) und ein Verlust der CK-MM ($56,78 \pm 0,76$ vs. $59,22 \pm 0,72\%$) festgestellt (Abbildung 15). Im rechten Ventrikel waren keine derartigen Unterschiede zu verzeichnen (Abbildung 16). In der TGR-Gruppe wurde eine Differenz zwischen den Isoenzymmustern des linken und rechten Ventrikel festgestellt (Abbildung 17). Die CK-MB war bei den TGR im linken Ventrikel vs. rechten signifikant erhöht ($16,54 \pm 0,61$ vs. $14,39 \pm 0,59\%$). Der Anteil der CK-MM war im linken Ventrikel vermindert ($56,78 \pm 0,76$ vs. $59,75 \pm 0,64\%$). Bei der CK-Mi und der CK-BB und bei den Mustern der Kontrollgruppe traten keine Veränderungen auf.

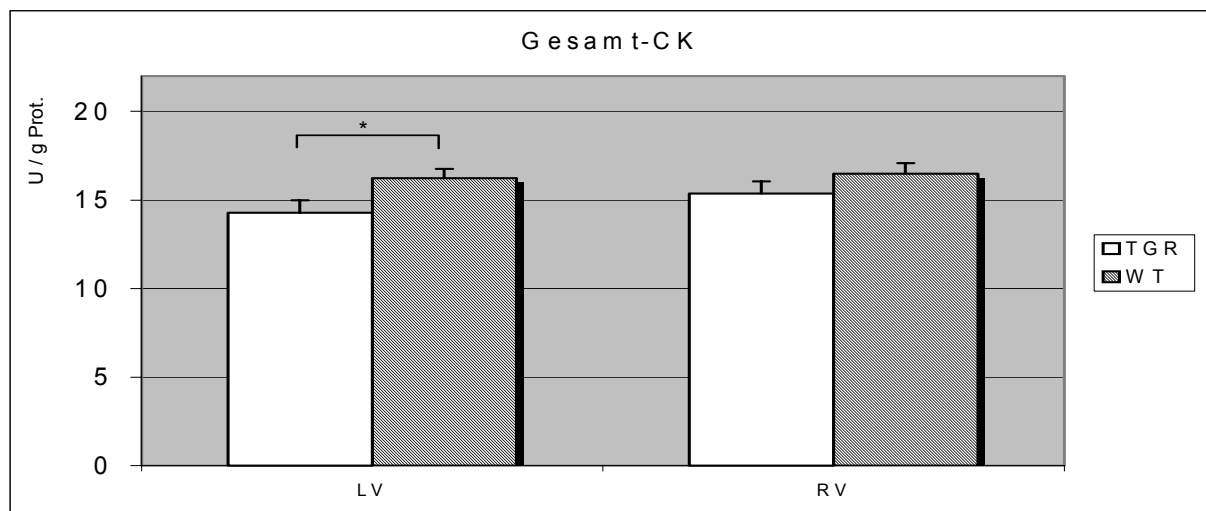


Abbildung 14: Gesamt-CK-Aktivität in den Herzhomogenaten der linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel von TGR und WT. $*p < 0,05$

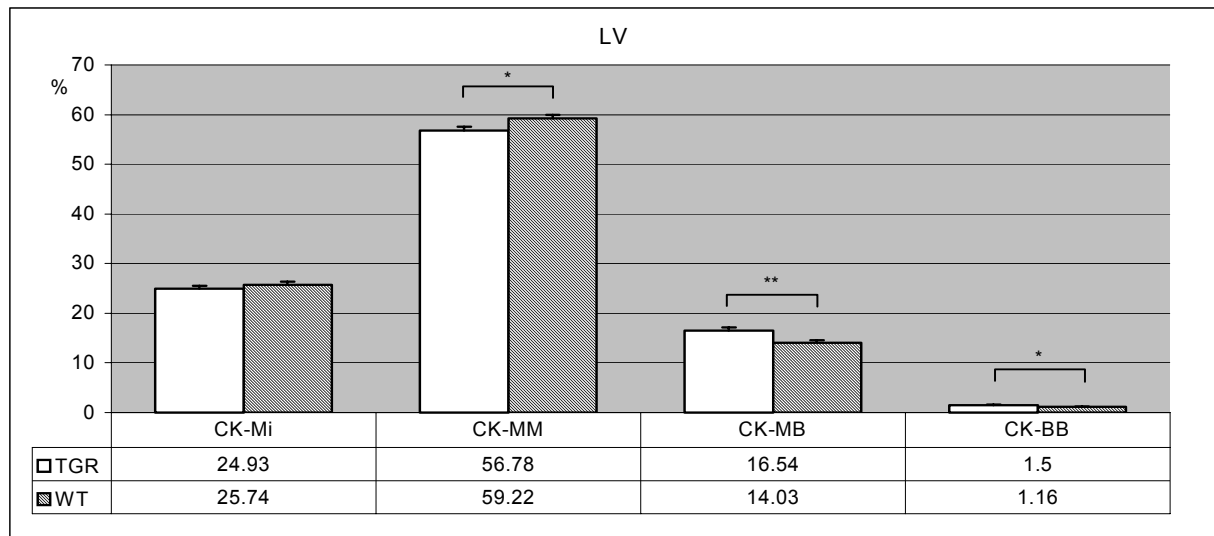


Abbildung 15: Myokardiale CK-Isoenzymmuster der linken Ventrikel (LV) von TGR und WT. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$

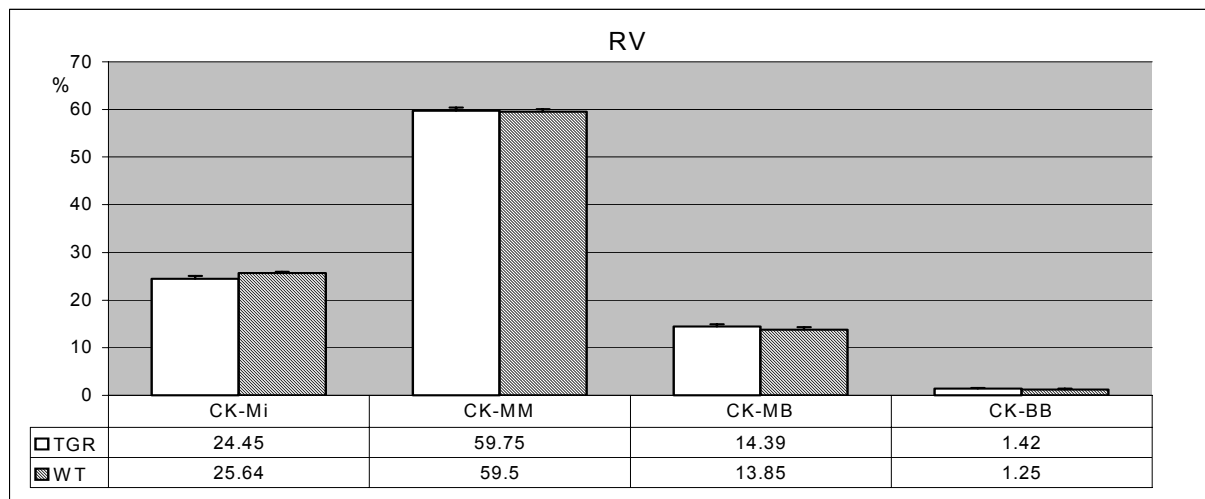


Abbildung 16: Myokardiale CK-Isoenzymmuster der rechten Ventrikel (RV) von TGR und WT.

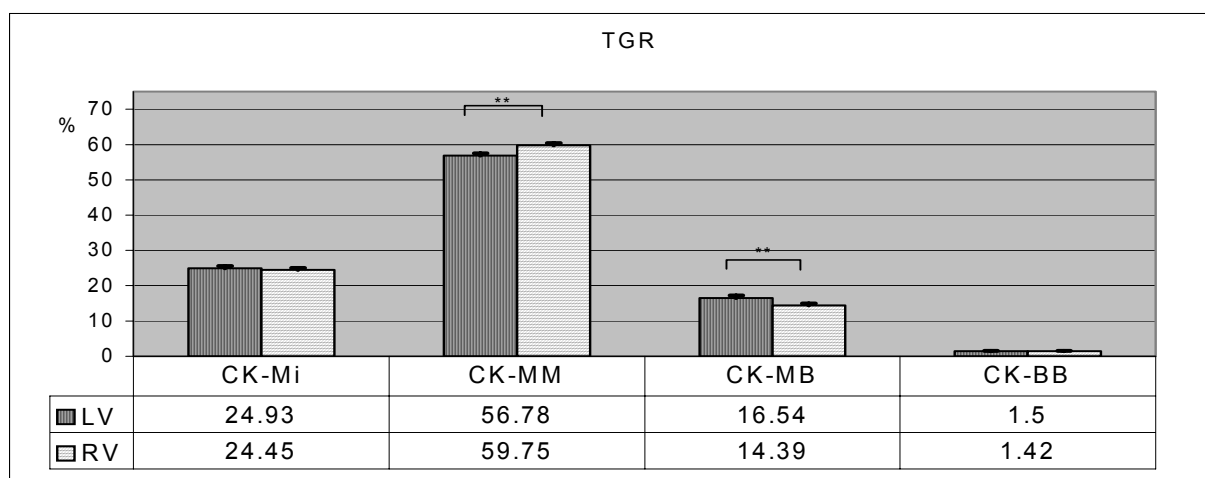


Abbildung 17: Myokardiale CK-Isoenzymmuster des linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels von TGR. $**p < 0,01$

5.1.3. Myokardiale antioxidative Enzyme

Wie Abbildung 18 zeigt, war die GSH-Px-Aktivität im linken und im rechten Ventrikel, sowie auch im Papillarmuskel der TGR signifikant höher als bei den WT. In der linken Kammer war sie um 14,5% ($404,96 \pm 17,32$ vs. $353,73 \pm 10,58$ U/g Protein), in der rechten um 22% ($413,42 \pm 15,41$ vs. $337,79 \pm 10,82$ U/g Protein) erhöht. Es bestand in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen linkem und rechten Ventrikel. In den Papillarmuskeln der TGR war die GSH-Px-Aktivität um 50,5% höher als im Papillarmuskeln der Kontrollen ($291,94 \pm 32,04$ vs. $193,99 \pm 8,08$ U/g Protein). Die Mittelwerte der Gesamt-SOD-Aktivität war bei den TGR vs. WT in beiden Ventrikeln geringgradig vermindert, allerdings ohne statistische Signifikanz (Abbildung 19).

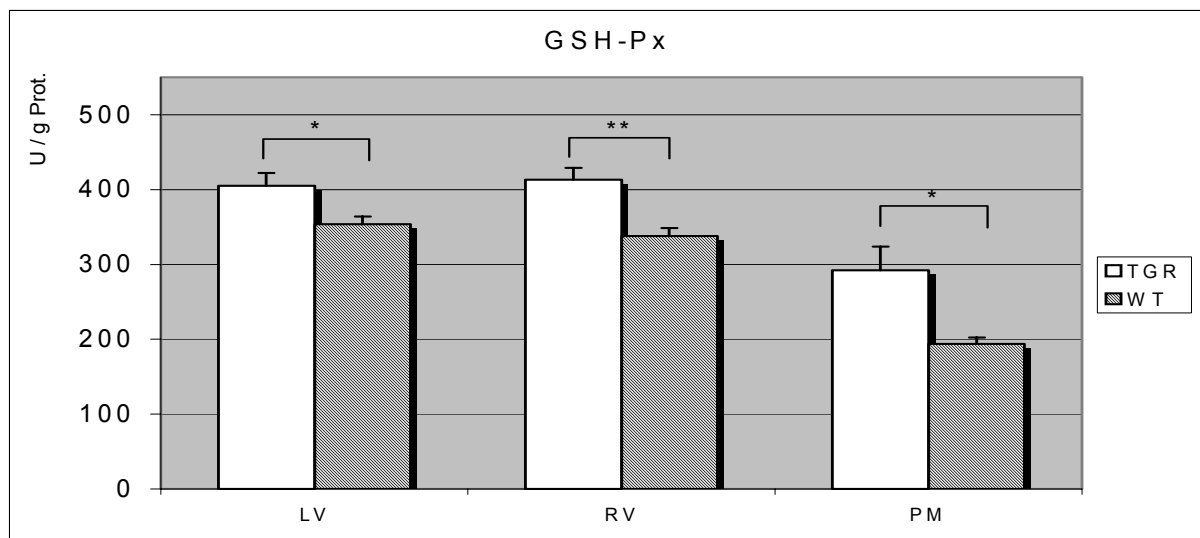


Abbildung 18: GSH-Px-Aktivitäten im linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel, sowie im Papillarmuskel (PM) von TGR und WT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

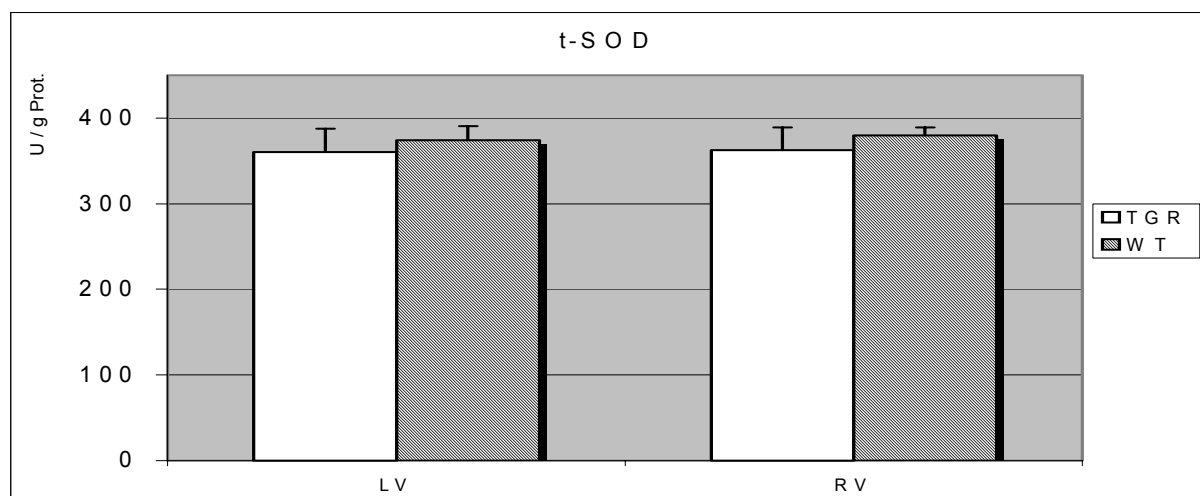


Abbildung 19: Gesamt-SOD-Aktivitäten im Herzgewebe der linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel von TGR und WT.

Auch für die CuZn-SOD-Aktivität wurden geringere Mittelwerte in beiden Ventrikeln der TGR im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden, ohne dass dies jedoch als signifikante Erniedrigung ausgewiesen werden konnte (Abbildung 20).

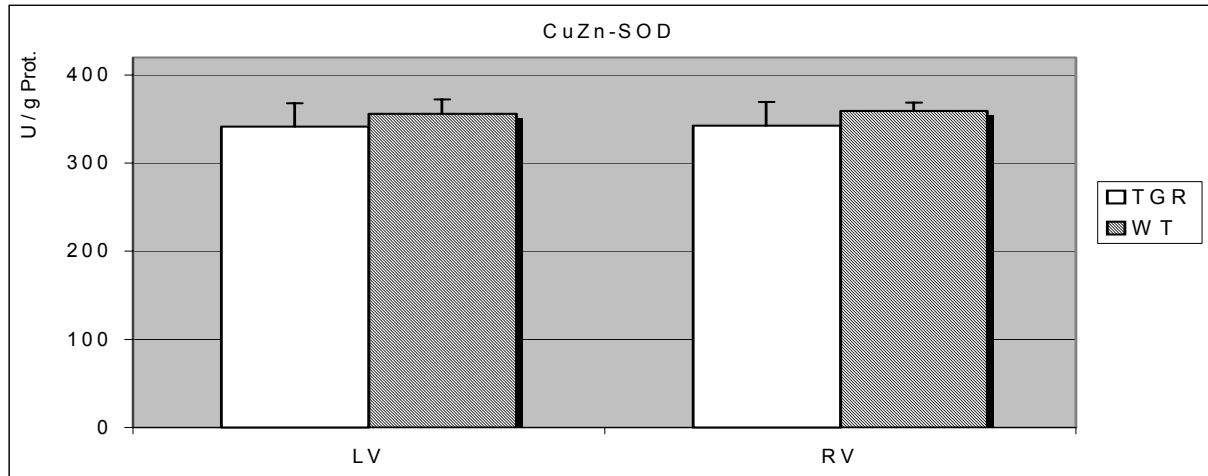


Abbildung 20: CuZn-SOD-Aktivitäten im Herzgewebe der linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel von TGR und WT.

Auch bei der Mn-SOD-Aktivität konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

5.1.4. Serum-Vitamin E-Gehalt

Der Gehalt an Vitamin E im Serum der transgenen Ratten war verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, ($17,94 \pm 0,67$ vs. $19,70 \pm 0,43$ $\mu\text{mol/l}$) (Abbildung 21).

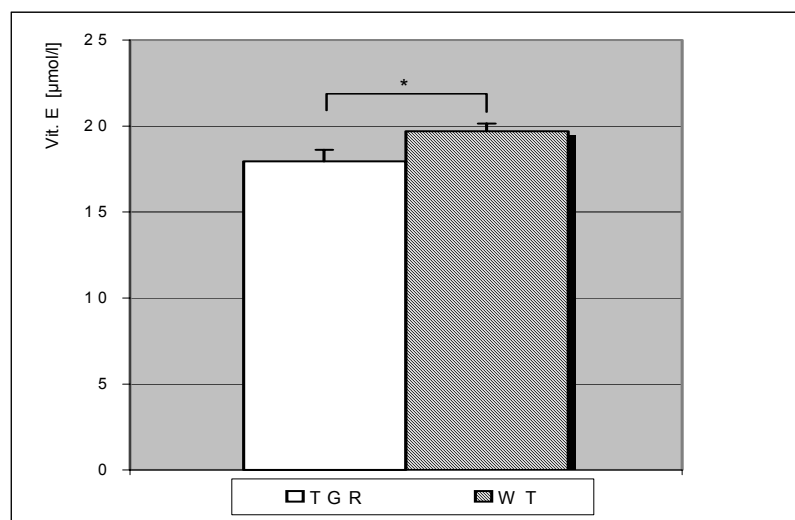


Abbildung 21: Vitamin E-Gehalt im Serum von TGR und WT. * $p < 0,05$

5.1.5. Lipidperoxidation

Abbildung 22 zeigt die Konzentration der Lipidperoxidationsprodukte in den Herzhomogenaten. In beiden Ventrikeln der TGR zeigte sich eine signifikante Erhöhung der TBARS im Vergleich zur Kontrollgruppe; im linken um 56% ($3,61 \pm 0,42$ vs. $2,31 \pm 0,20$ nmol/mg Protein) und im rechten um 44,5% ($2,89 \pm 0,29$ vs. $2,00 \pm 0,14$ nmol/mg Protein). Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen linkem und rechtem Ventrikel der TGR gefunden. Die Konzentration der TBARS im linken Ventrikel war um 25% höher als im rechten ($3,61 \pm 0,42$ vs. $2,89 \pm 0,29$ nmol/mg Protein). Dieser Unterschied wurde bei der Kontrollgruppe nicht beobachtet ($2,31 \pm 0,20$ vs. $2,00 \pm 0,14$ nmol/mg Protein)

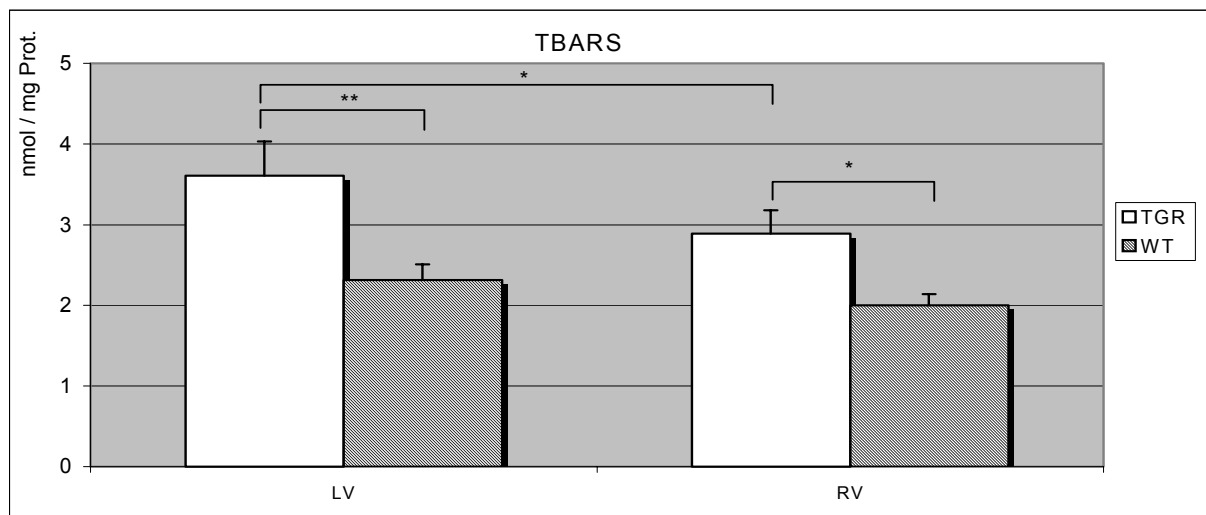


Abbildung 22: Myokardialer Gehalt an TBARS in den linken (LV) und rechten (RV) Ventrikeln der TGR und WT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.1.6. Stressproteine

In Abbildung 23 und Abbildung 24 sind die Hsp25- und 72-Konzentrationen im linken und rechten Ventrikel sowie im Papillarmuskel von TGR- und WT-Tieren gegenübergestellt. Dabei zeigte sich im linken Ventrikel von TGR verglichen mit den WT eine um $37,1 \pm 10,5\%$ höhere Hsp25-Konzentration. Im rechten Ventrikel zeigte sich keine statistisch belegbare Differenz. Im Papillarmuskel der TGR war das Hsp25 um $98,44 \pm 31,9\%$ höher als bei den Kontrollen. Für das Hsp72 konnten weder im linken noch im rechten Ventrikel signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Auch im Papillarmuskel unterschied sich die Hsp72-Konzentration zwischen TGR und WT nicht.

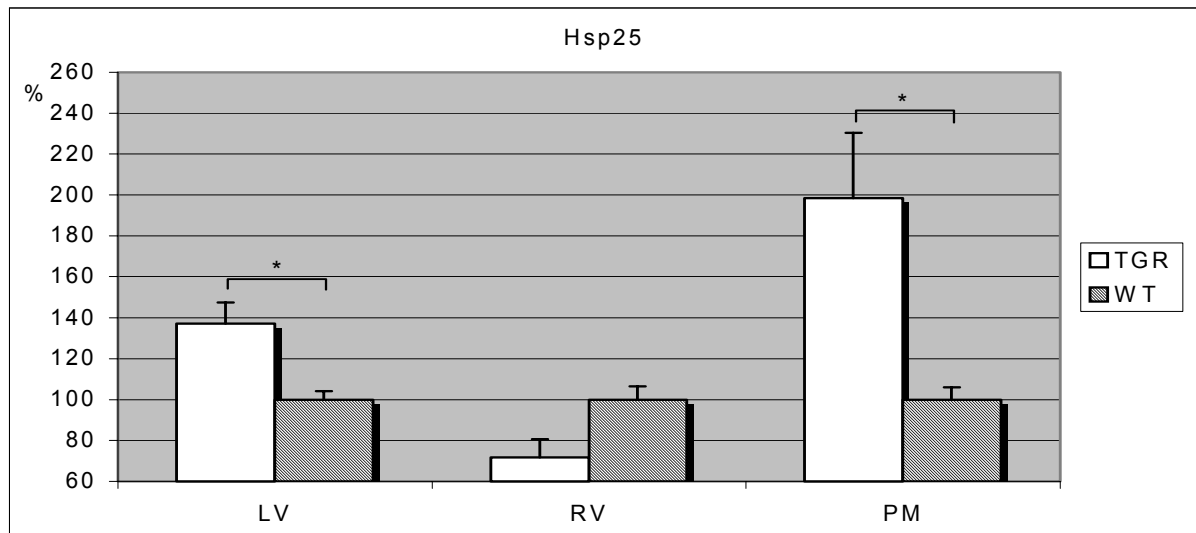


Abbildung 23: Konzentrationen von Hsp25 im linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel, sowie im Papillarmuskel von TGR und WT. * $p < 0,05$;

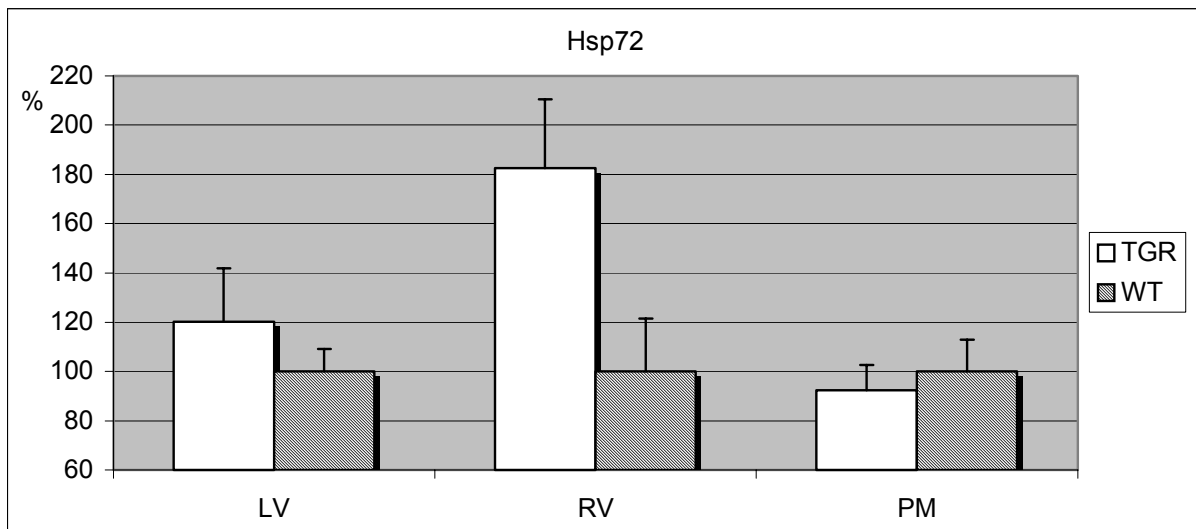


Abbildung 24: Konzentrationen von Hsp72 in den linken (LV) und rechten (RV) Ventrikeln von TGR und WT.

5.1.7. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung

In den Abbildungen 25, 26 und 27 sind die funktionellen Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung in Gestalt der Peak force (PF), der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit zusammengestellt. Unter aeroben Bedingungen, vor Beginn der Hypoxie (0 Minuten) war die PF, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit der isometrischen Kontraktion in beiden Gruppen vergleichbar. Mit Einsetzen der Hypoxie kommt es in beiden Gruppen zur Verminderung der PF, allerdings stärker bei den WT als bei den TGR, was in einer signifikanten Differenz nach 5 ($0,919 \pm 0,044$ vs. $0,809 \pm 0,021$) und 10 Minuten ($0,468 \pm 0,056$ vs. $0,302 \pm 0,013$) resultiert. Nach 15 Minuten

Hypoxie bestand kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen und die PF war auf 24% (TGR) bzw. 17% (WT) erniedrigt. In der Phase der Reoxygenierung kam es in der TGR-Gruppe zu einer schnelleren Erholung der PF, die bei den TGR im Gegensatz zu den WT nach 60 Minuten den aeroben Ausgangswert wieder erreichte. Es resultierte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TGR und WT nach 45 Minuten ($0,930 \pm 0,116$ vs. $0,605 \pm 0,057$) und 60 Minuten ($1,129 \pm 0,131$ vs. $0,678 \pm 0,06$) (Abbildung 25).

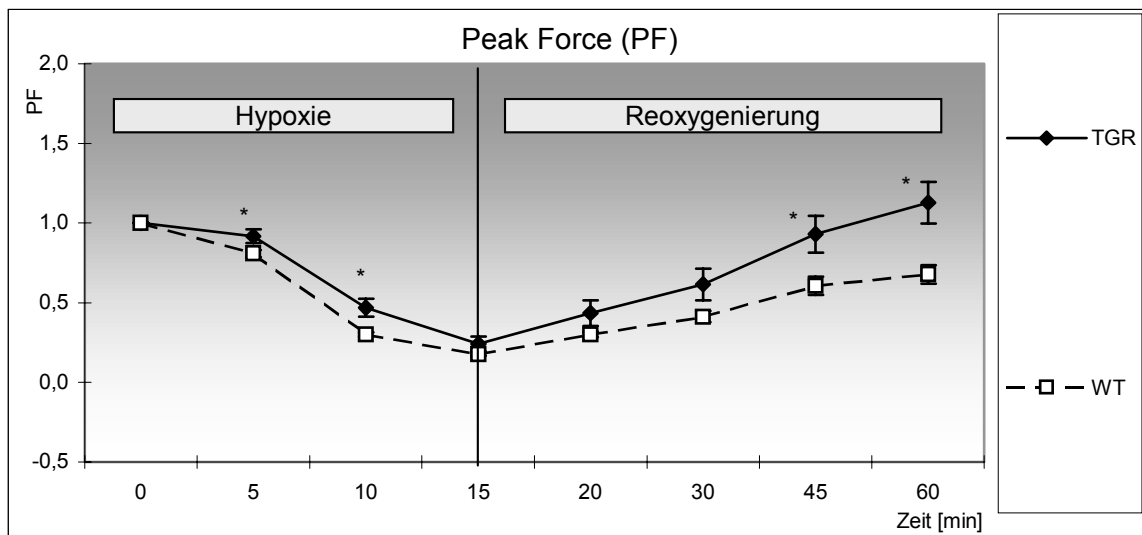


Abbildung 25: Peak force (PF) der Papillarmuskeln von TGR und WT während Hypoxie und Reoxygenierung. * $p < 0,05$

Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten nahmen in beiden Gruppen während der hypoxischen Phase erwartungsgemäß ab. Dabei fiel die Abnahme bei den TGR zunächst geringer aus (nach 10 Minuten dF/dt_{\max} : $0,584 \pm 0,078$ vs. $0,372 \pm 0,020$; dF/dt_{\min} : $0,555 \pm 0,079$ vs. $0,393 \pm 0,037$), glich sich aber zum Ende der 15minütigen Hypoxiephase wieder den Kontrollen an (Abbildung 26 und 27).

Während der Reoxygenierungsphase zeigte sich, ähnlich der PF, eine schnellere Erholung der dF/dt_{\max} und der dF/dt_{\min} in der TGR-Gruppe. So ergab sich bei der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit nach 60 Minuten eine signifikante Differenz zwischen den, zum Ausgangslevel zurückkehrenden TGR ($1,104 \pm 0,135$) und der nur 69%igen Erholung bei den WT ($0,686 \pm 0,073$) (Abbildung 26) Auch bei der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit verläuft die Erholung bei den TGR schneller und vollständig im Vergleich zu den Kontrollen. Hier treten schon nach 45 Minuten signifikante Unterschiede zwischen TGR und WT auf ($0,887 \pm 0,113$ vs. $0,536 \pm 0,077$). Am Ende der 60minütigen Reoxygenierungszeit liegen die TGR über dem aeroben Ausgangswert ($1,126 \pm 0,136$), wohingegen die WT nur 64% erreichen ($0,642 \pm 0,083$) (Abbildung 27).

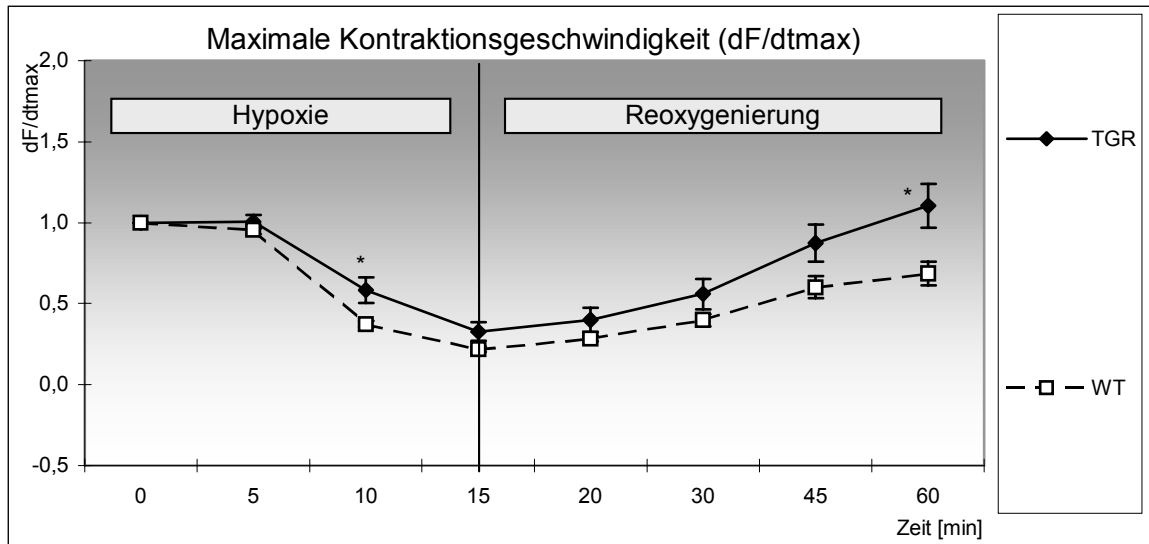


Abbildung 26: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) der Papillarmuskeln von TGR und WT während Hypoxie und Reoxygenierung. * $p < 0,05$

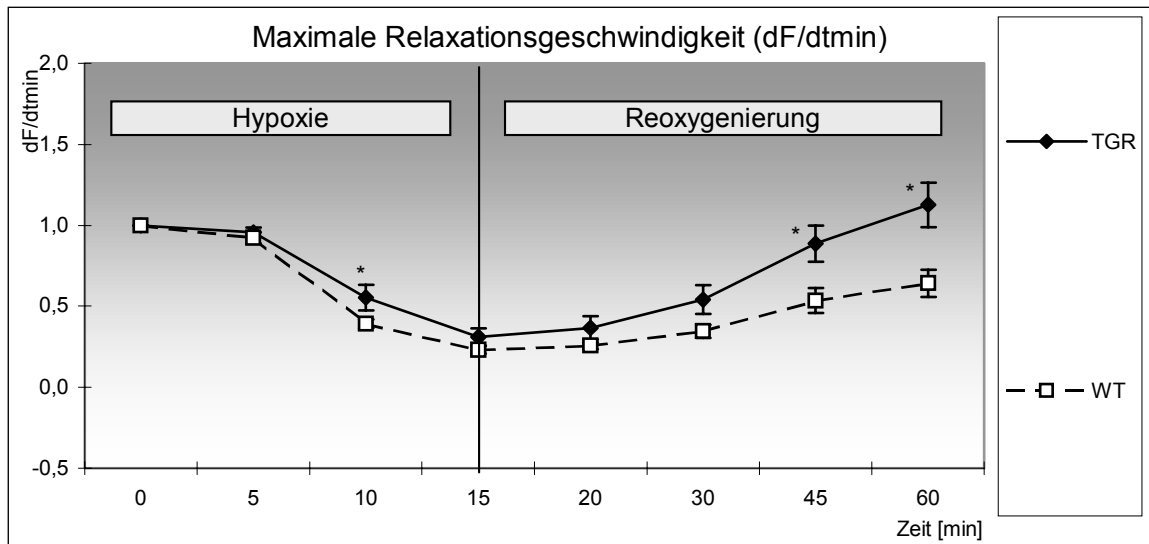


Abbildung 27: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) der Papillarmuskeln von TGR und WT während Hypoxie und Reoxygenierung. * $p < 0,05$

5.2. Ergebnisse 2. Tiermodell: Myokardinfarktinduzierte Herzhypertrophie bei Ratten

5.2.1. Charakterisierung der Myokardinfarktphasen

Zur Auswertung der gewonnenen Daten erwies es sich als günstig in eine akute und postakute Phase nach Myokardinfarkt (MI) zu unterteilen. In der akuten Myokardinfarktphase wurden Tiere mit MI und scheinoperierte Tiere 1.) 14-16 h nach Ligatur-Infarkt verglichen und 2.) die Situation nach 14-16 h in Relation zum Zustand nach 3 Wochen betrachtet. Als postakute Myokardinfarktphase wird der Zeitraum der 3. bis 9. Woche nach Infarkt angesehen.

Zur Darstellung der Daten wurde die in Abbildung 28 gezeigte Diagramm-Form gewählt: unter dem Graphen sind immer die signifikanten Unterschiede der Kontrollen über die Zeit gekennzeichnet. Oberhalb des Graphen sind die signifikanten Veränderungen in der Infarktgruppe über die entsprechende Zeitspanne dargestellt. Direkt am Messpunkt sind die signifikanten Verschiedenheiten zwischen der Infarkt- und Kontrollgruppe ausgewiesen.

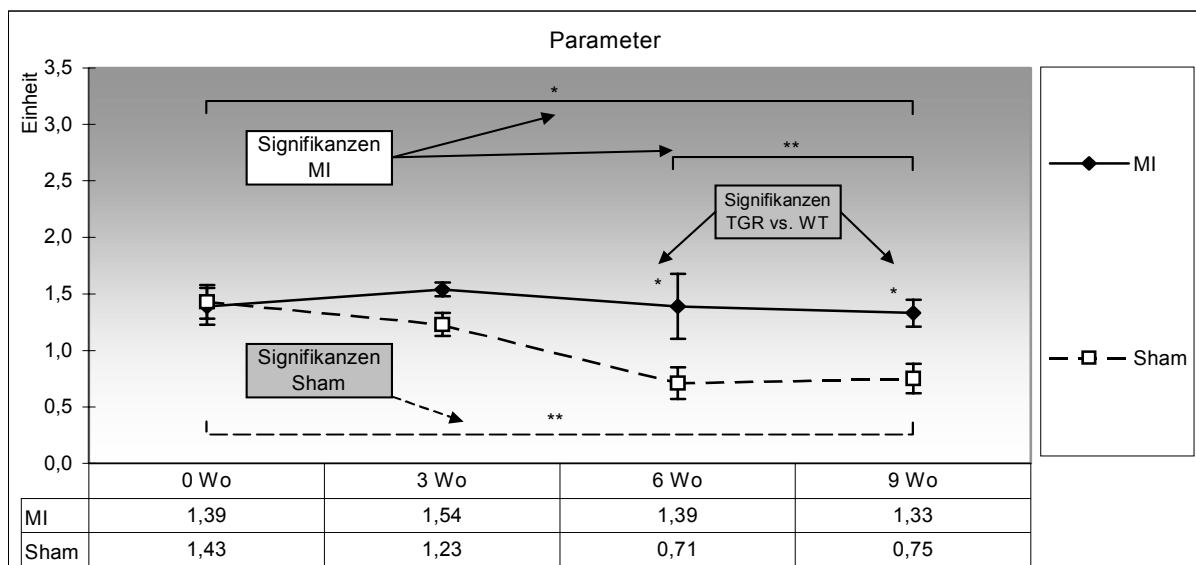


Abbildung 28: Muster-Diagramm zur Erläuterung der Ergebnis-Darstellung

5.2.2. Körpergewicht, Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex

In Tabelle 8 sind die Körpergewichte, die Ventrikelgewichte, und wichtige Hypertrophieindizes zusammengefasst. Zusätzlich ist der Lungengewicht/Körpergewicht-Quotient als Insuffizienzparameter aufgeführt.

Das Körpergewicht (KG) der Infarkt-, als auch der Kontrolltiere stieg kontinuierlich mit zunehmenden Alter der Tiere an, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen abzeichnete.

Das Gesamt-Ventrikelgewicht (VG) zeigte während der akuten Myokardinfarktphase einen gleichartigen Anstieg bei beiden Tiergruppen, ohne dass sich die beiden Gruppen signifikant voneinander unterschieden. Im postakuten Verlauf kam es zu einer größeren Zunahme des VG bei den MI-Tieren, woraus ein signifikanter Unterschied zwischen MI- und Sham-Gruppe nach 6 und 9 Wochen resultiert. Dieser Unterschied der Gesamt-Ventrikelgewichte lässt sich in erster Linie auf Änderungen des linksventrikulären Gewichts (LVG) zurückführen. Während das rechtsventrikuläre Gewicht (RVG) nur nach 9 Wochen die Tendenz einer Gewichtszunahme nach MI zeigte, kam es beim linksventrikulären Ventrikelgewicht der MI-Tiere zu einem Anstieg in der postakuten Phase mit der Konsequenz signifikant verschiedener Werte nach 6 und 9 Wochen.

Beim Vergleich der Hypertrophiegrade (VG/KG, LVG/KG, RVG/KG) ergibt sich der signifikante Unterschied im Herzgewicht/Körpergewicht-Quotienten zwischen MI-Tieren und scheinoperierten Kontrollen, nach 6 und 9 Wochen ebenfalls aus den Veränderungen des linken Ventrikels, da nur LVG/KG bei den MI-Tieren signifikant größer war.

Bei der Untersuchung des Lungengewicht/Körpergewicht-Quotienten (LG/KG), der als Marker für die mit Lungenstauung einhergehende kardiale Insuffizienz gilt, ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Infarkt- und scheinoperierten Tieren nachweisen.

Parameter		MI	Sham	p (MI vs. Sham)
Körpergewicht (KG)	0 Wo	271,33±4,15	264,18±4,55	n.s.
	3 Wo	371,27±16,56	364,36±13,48	n.s.
	6 Wo	450,45±14,37	452,58±16,36	n.s.
	9 Wo	462,92±12,01	478,67±12,08	n.s.
Gesamt-Ventrikelgewicht (VG)	0 Wo	1,01±0,02	0,95±0,03	n.s.
	3 Wo	1,28±0,12	1,25±0,04	n.s.
	6 Wo	1,44±0,05	1,33±0,05	0,05
	9 Wo	1,51±0,06	1,39±0,04	0,05
Linksventrikuläres Gewicht (LVG)	0 Wo	0,72±0,02	0,70±0,03	n.s.
	3 Wo	0,97±0,12	0,95±0,04	n.s.
	6 Wo	1,10±0,03	1,02±0,04	0,05
	9 Wo	1,15±0,05	1,06±0,04	0,05
Rechtsventrikuläres Gewicht (RVG)	0 Wo	0,28±0,02	0,25±0,01	n.s.
	3 Wo	0,31±0,06	0,30±0,01	n.s.
	6 Wo	0,33±0,03	0,31±0,01	n.s.
	9 Wo	0,36±0,02	0,33±0,01	0,1
VG/KG	0 Wo	3,72±0,08	3,51±0,10	n.s.
	3 Wo	3,46±0,24	3,45±0,12	n.s.
	6 Wo	3,21±0,10	2,95±0,09	0,05
	9 Wo	3,26±0,13	2,90±0,08	0,01
LVG/KG	0 Wo	2,67±0,08	2,58±0,06	n.s.
	3 Wo	2,61±0,24	2,64±0,10	n.s.
	6 Wo	2,47±0,08	2,26±0,08	0,05
	9 Wo	2,48±0,10	2,22±0,08	0,05
RVG/KG	0 Wo	1,05±0,06	0,93±0,06	n.s.
	3 Wo	0,85±0,17	0,82±0,10	n.s.
	6 Wo	0,75±0,06	0,68±0,08	n.s.
	9 Wo	0,78±0,05	0,69±0,08	n.s.
Lungengewicht/Körpergewicht (LG/KG)	0 Wo	7,01±0,26	6,06±0,56	n.s.
	3 Wo	5,24±0,28	5,50±0,50	n.s.
	6 Wo	5,27±0,88	4,11±0,23	n.s.
	9 Wo	5,17±0,69	4,21±0,26	n.s.

Tabelle 8: Gewichtsdaten, Hypertrophieindizes und Insuffizienzparameter der Infarkt-Tiere (MI) vs. scheinoperierte Tiere (Sham) 0, 3, 6 und 9 Wochen nach Operation

5.2.3. Myokardialer CK-Gehalt und CK-Isoenzymmuster

In der akuten Myokardinfarktphase wurde keine Beeinflussung des myokardialen CK-Systems beobachtet. Nach 3 Wochen ($p < 0,1$) und nach 9 Wochen ($p < 0,01$) wurden im linken Ventrikel der MI-Tiere niedrigere Gesamt-CK-Aktivitäten beobachtet. Nach 6 Wochen war der Unterschied zwischen MI- und Kontrolltieren statistisch nicht zu sichern, obwohl auch zu diesem Zeitpunkt der Mittelwert der MI-Tiere unter dem der Kontrollen lag. Ein derartiger Unterschied wurde für den rechten Ventrikel nicht gefunden. (Abbildung 29)

Auffällig war, dass im rechten Ventrikel beider Versuchsgruppen die Gesamt-CK-Aktivität bis zur 6. Woche anstieg, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten vorlag. Dabei war in der Infarktgruppe, im Gegensatz zu den Kontrollen die Gesamt-CK-Aktivität auch nach 9 Wochen noch signifikant höher als zum Zeitpunkt 0 Wochen (Abbildung 30).

Bei den CK-Isoenzymen unterschieden sich die CK-Mi- und CK-MM-Anteile sowohl in der Akutphase, als auch in der postakuten Phase (3.-9. Woche) in beiden Ventrikeln der MI-Tiere verglichen mit den Sham-Tieren nicht voneinander. Ab der 3. postoperativen Woche nehmen bei den Sham-Tieren die CK-Mi-Fraktionen sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel der Kontrolltiere kontinuierlich ab (Abbildung 31 und 32), wohingegen in diesem Zeitraum die CK-MM-Anteile steigen (Abbildung 33 und 34). Daraus resultierten nach 9 Wochen - verglichen mit dem 3-Wochen-Wert - signifikant niedrigere CK-Mi bzw. höhere CK-MM-Werte. Mit Ausnahme der CK-Mi im rechten Ventrikel konnten diese Beobachtungen auch bei den Infarkt-Tiere gemacht werden.

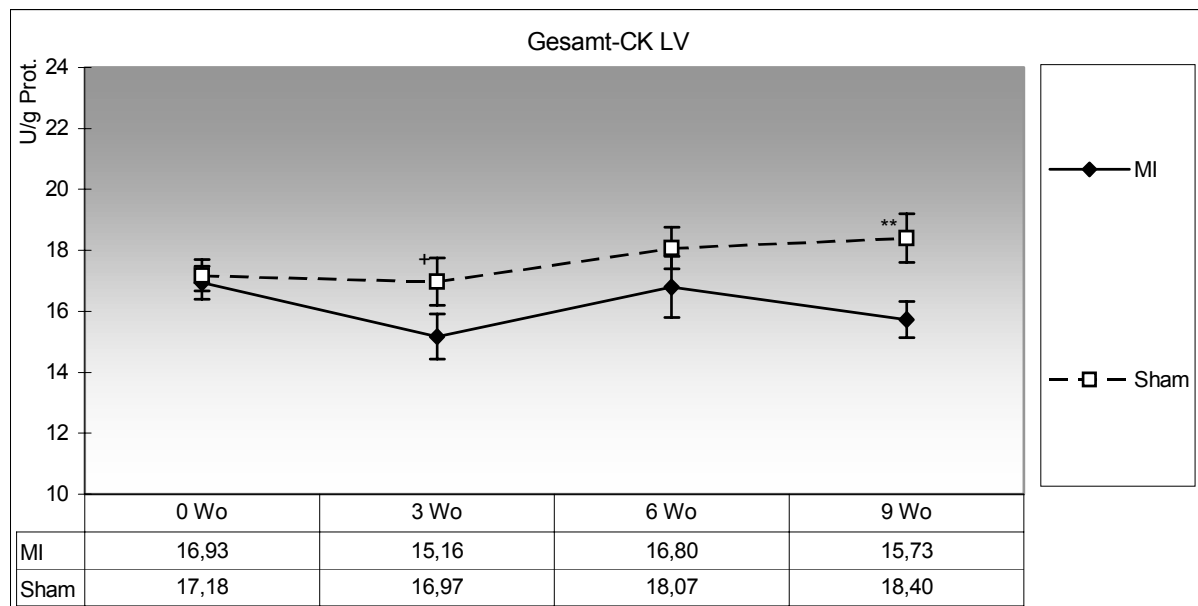


Abbildung 29: Gesamt-CK-Aktivität in den linken Ventrikel (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p < 0,1$, ** $p < 0,01$

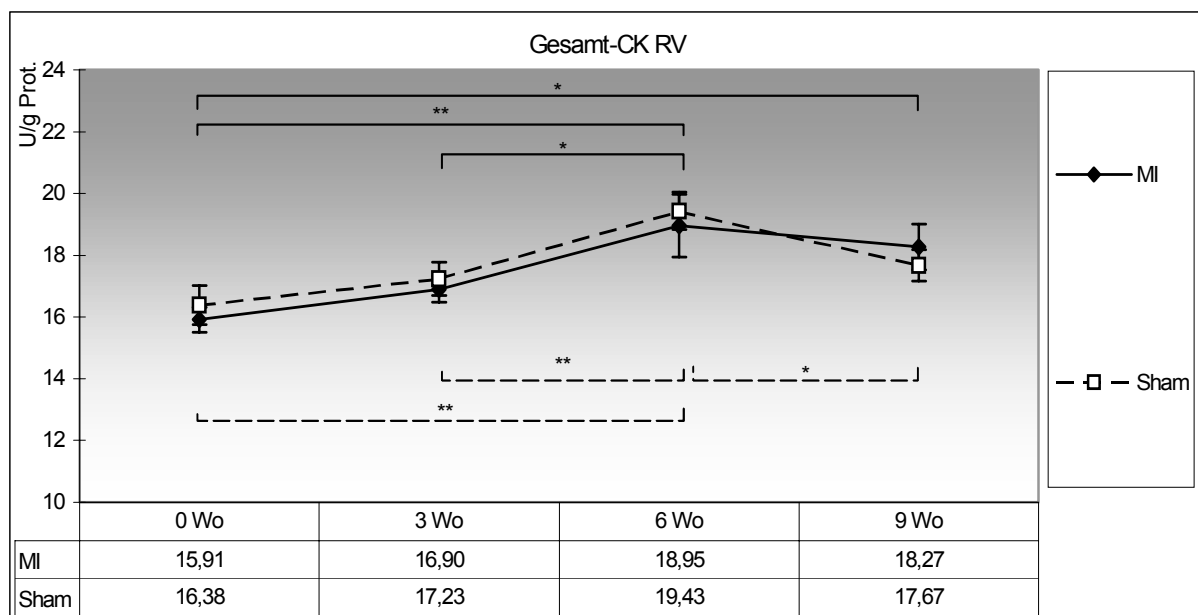


Abbildung 30: Gesamt-CK-Aktivität in den rechten Ventrikeln (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

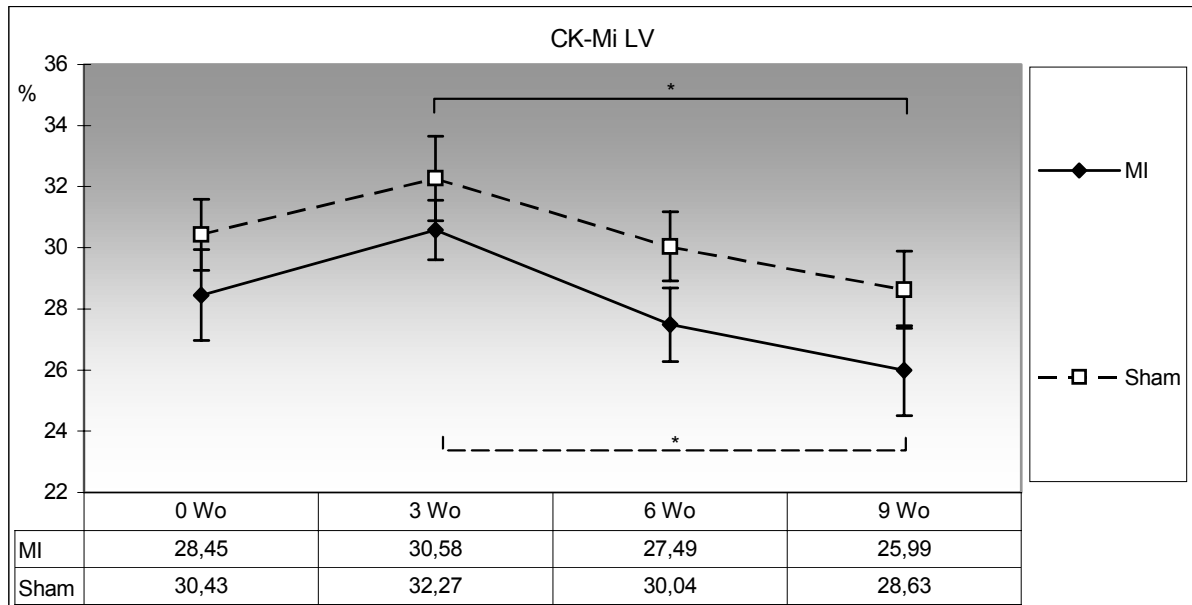


Abbildung 31: CK-Mi-Fractionen in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$

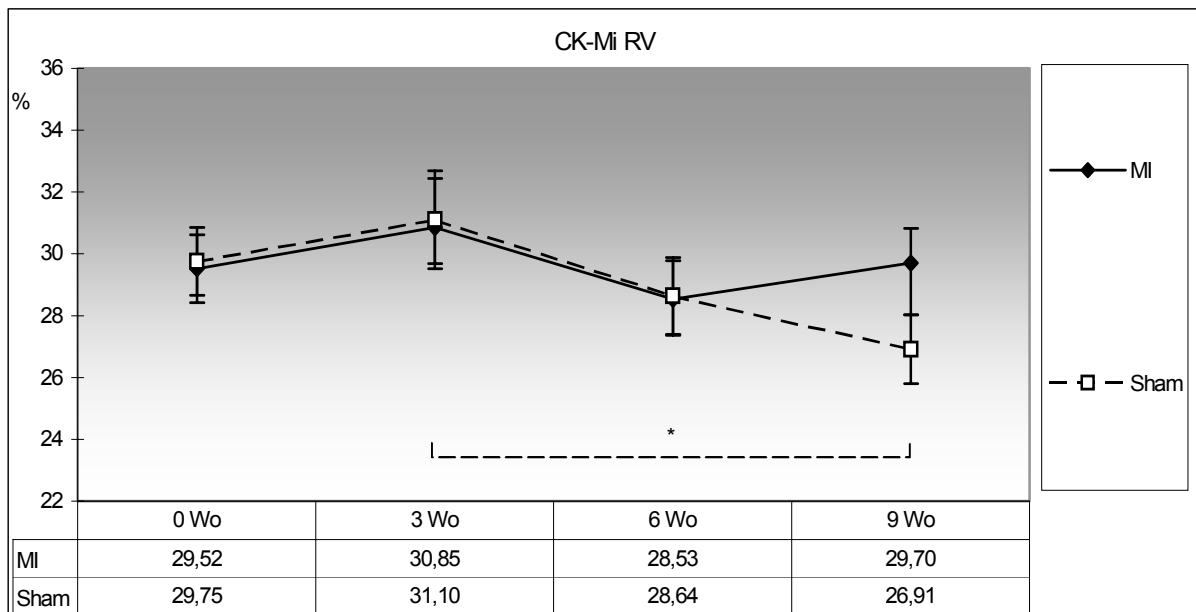


Abbildung 32: CK-Mi-Fractionen in den rechten Ventrikeln (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$

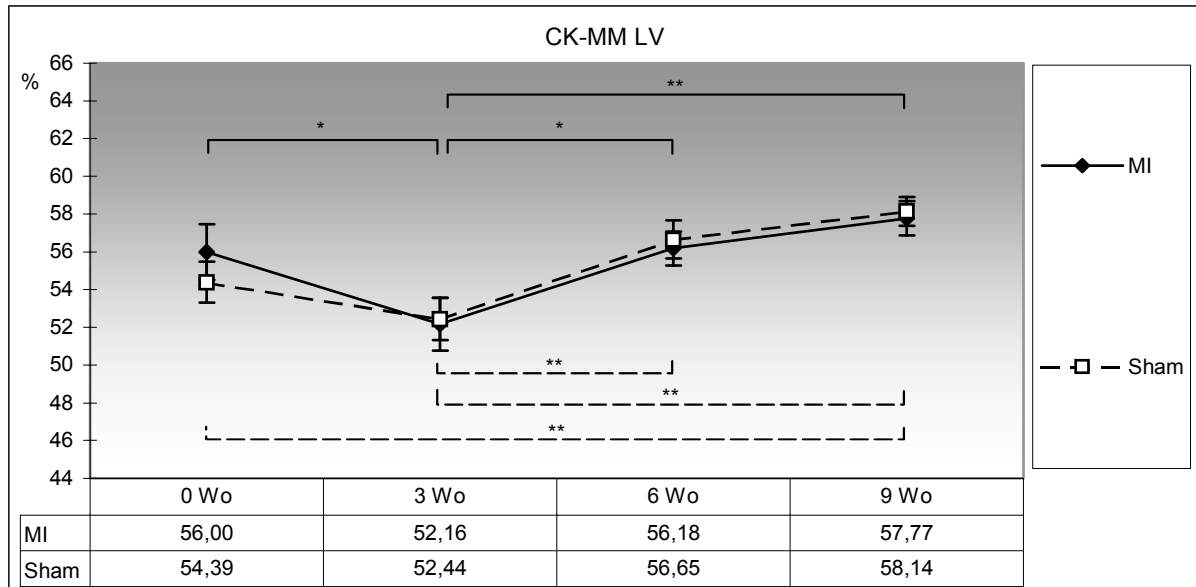


Abbildung 33: CK-MM-Fractionen in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

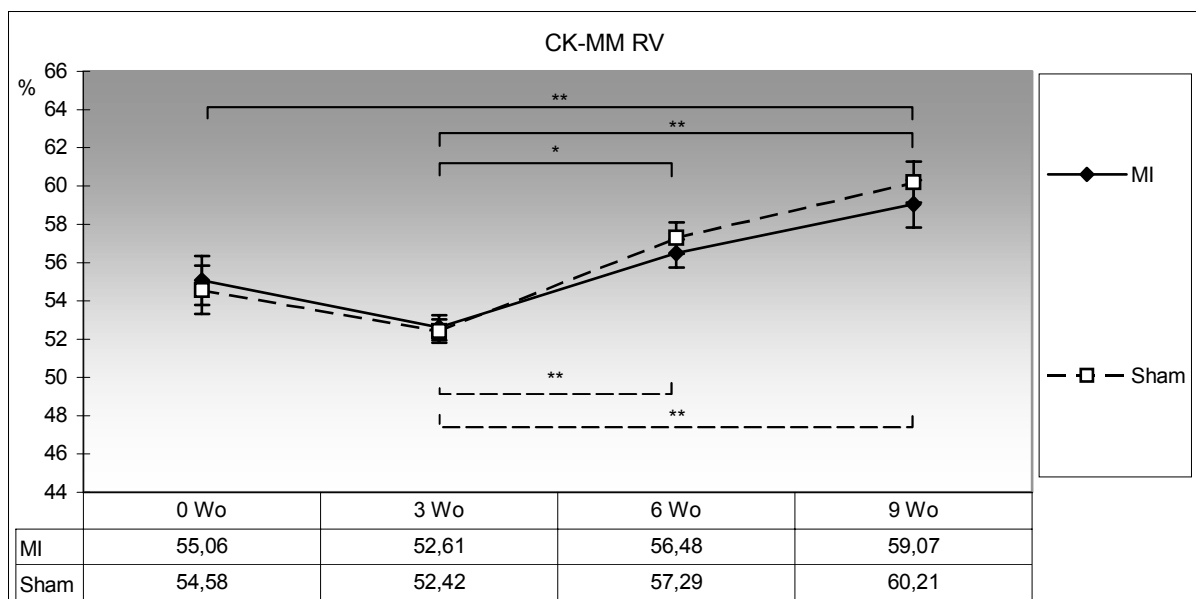


Abbildung 34: CK-MM-Fractionen in den rechten Ventrikeln (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die Abbildungen 35 bis 38 zeigen den Verlauf der CK-MB- und CK-BB-Aktivitäten. Erste Veränderungen im CK-Isoenzymmuster, die sich in einer signifikanten Verschiebung des myokardialen Isoenzymmusters zu höheren CK-MB und CK-BB-Anteilen zeigten, wurden erst ab 3 Wochen nach OP sichtbar und beschränkten sich auf den linken Ventrikel. Dort wurde die höchste CK-MB-Aktivität in der 3. Post-Infarkt-Woche gemessen und lag damit deutlich über dem Wert der Kontrollen. Aber auch nach 6 ($p < 0,1$) und 9 Wochen ($p < 0,05$) waren in der Infarktgruppe höhere CK-MB-Werte nachweisbar (Abbildung 35). Die CK-BB-Aktivität erreichte im linken Ventrikel ebenfalls ihren höchsten Wert 3 Wochen nach Infarkt und lag 6

und 9 Wochen danach immer noch signifikant über dem Niveau bei Versuchsbeginn. Daraus resultierten verglichen mit der Kontrollgruppe zu den Untersuchungszeitpunkten 3 ($p < 0,01$), 6 ($p < 0,1$) und 9 ($p < 0,05$) Wochen höhere CK-BB-Aktivitäten im linken Ventrikel (Abbildung 36). Im rechten Ventrikel sank die CK-MB- und CK-BB-Aktivität bei MI-Tieren und Kontrollen zur 9. Woche hin ab. Ein vergleichbares Verhalten wurde tendenziös im linken Ventrikel der scheinoperierten Tiere beobachtet. Bei den MI-Tieren kam es im rechten Ventrikel nach zunächst stabilem Verlauf der MB- und BB-Isoformen zu einem signifikanten Abfall in der 9. postoperativen Woche (Abbildung 37 und 38).

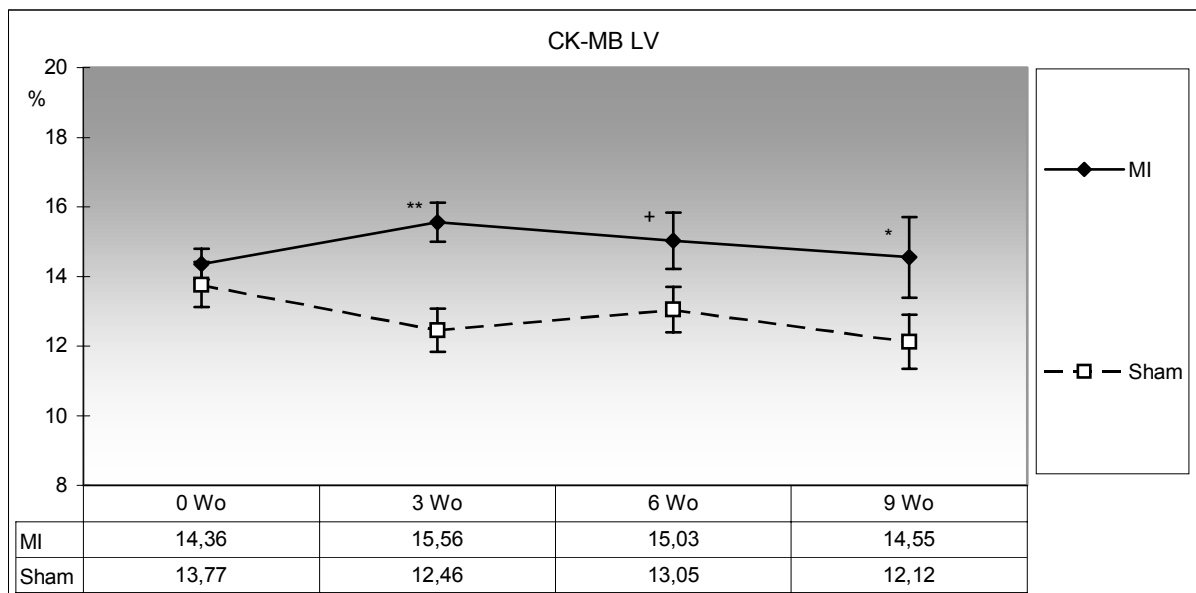


Abbildung 35: CK-MB-Fractionen in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

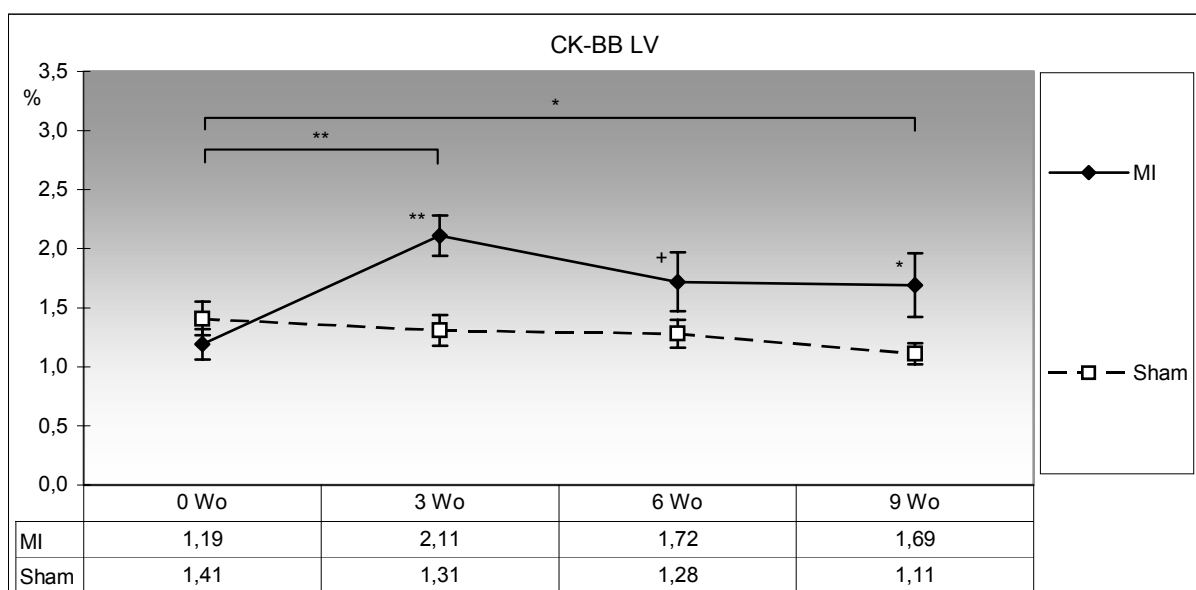


Abbildung 36: CK-BB-Fractionen in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

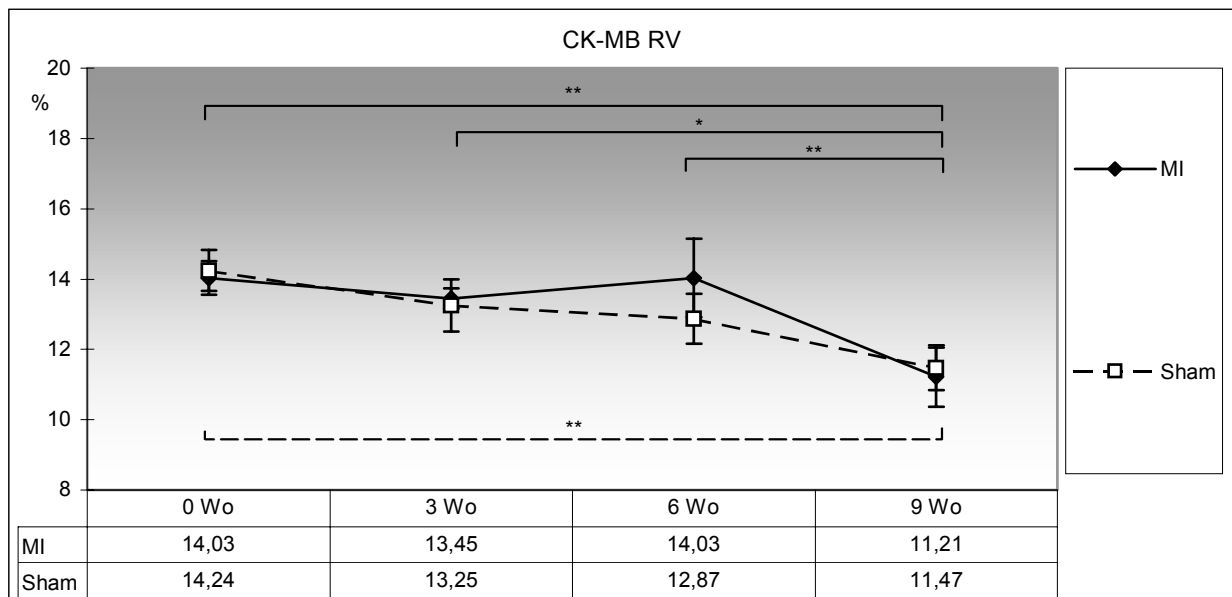


Abbildung 37: CK-MB-Fraktionen in den rechten Ventrikeln (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

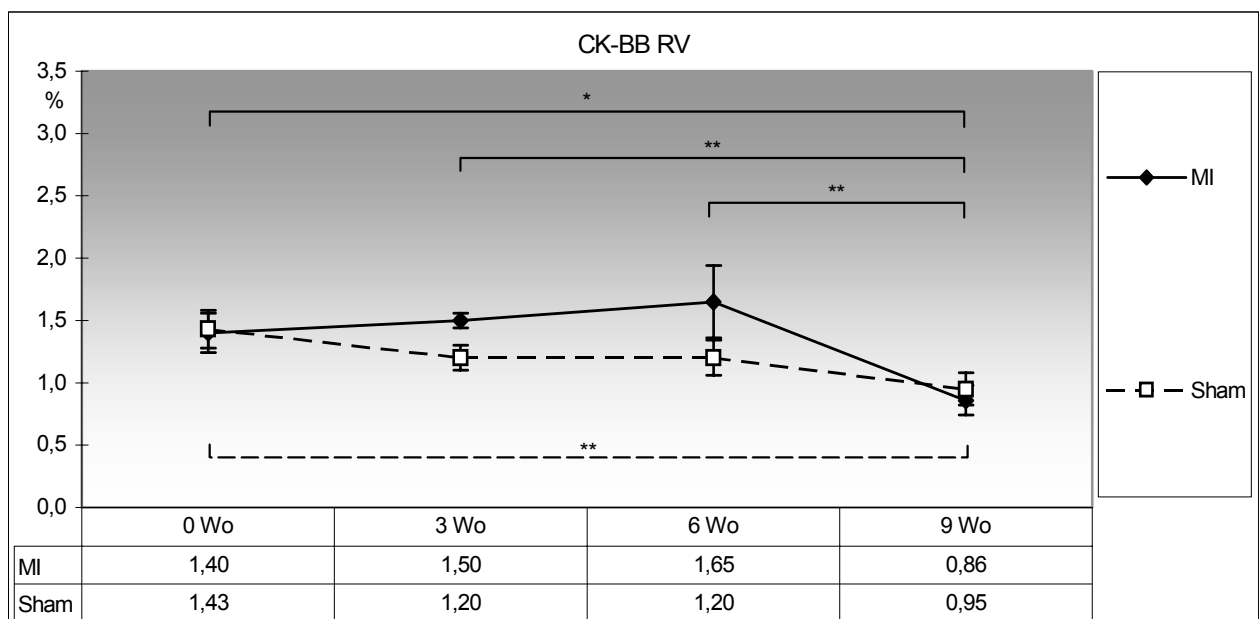


Abbildung 38: CK-BB-Fraktionen in den rechten Ventrikeln (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.2.4. Myokardiale antioxidative Enzyme

In der Akutphase nach MI lag die Aktivität der GSH-Px im linken Ventrikel signifikant ($p < 0,01$) und im rechten Ventrikel mit Borderline-Signifikanz ($p < 0,1$) über der der scheinooperierten Tiere. Die gesteigerte GSH-Px-Aktivität war auch 3 Wochen nach Infarkt im Vergleich zu den Kontrollen vorhanden (Abbildung 39 und 40).

Postakut kam es im linken Ventrikel der Infarkt-Tiere bis zur 6. Woche nach MI zu einem weiteren kontinuierlichen Anstieg der GSH-Px-Aktivität; danach bleibt das hohe Niveau bis zur 9. Woche erhalten. Die scheinooperierten Tiere wiesen bis zur 6. bzw. 9. Woche einen vergleichbaren zeitabhängigen Verlauf auf ohne jedoch die Aktivitätszunahmen in den infarzierten Tieren zu erreichen, so dass nach 6 und 9 Wochen die MI-Tiere - im Vergleich zu den scheinooperierten Tieren - durch signifikant höhere GSH-Px-Aktivitäten im linken Ventrikel gekennzeichnet sind (Abbildung 39).

Im rechten Ventrikel lag die GSH-Px-Aktivität 3 Wochen nach MI noch mit Borderline-Signifikanz ($p < 0,1$) über der Aktivität der Kontrollen. 6 und 9 Wochen nach OP sind im rechten Ventrikel keine Unterschiede mehr zwischen den myokardialen GSH-Px-Leveln von MI- und Sham-Gruppe nachweisbar (Abbildung 40).

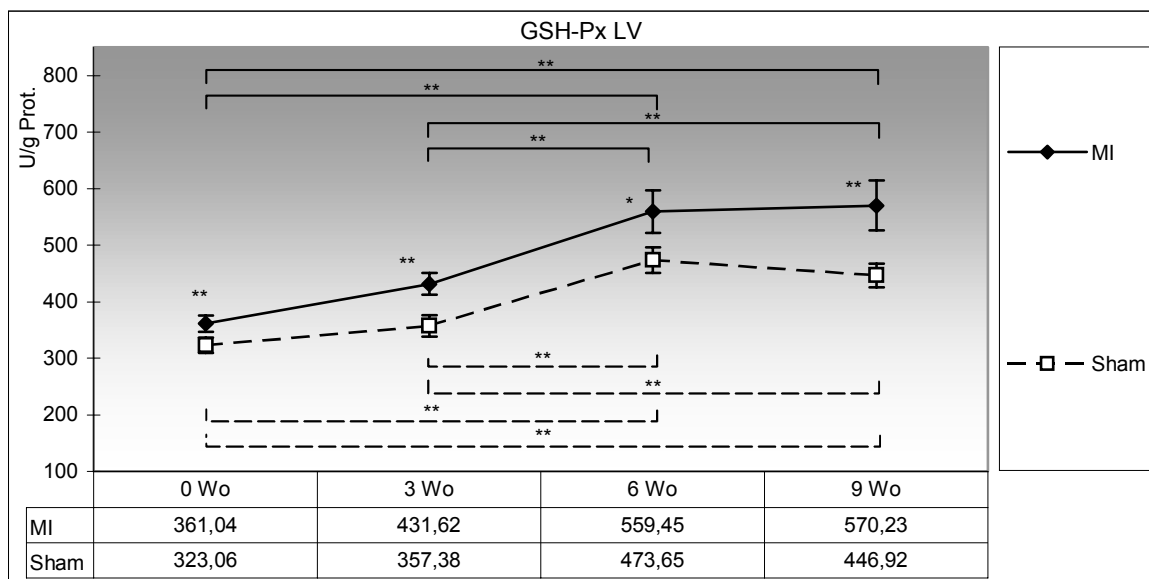


Abbildung 39: GSH-Px-Aktivitäten im linken Ventrikel (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

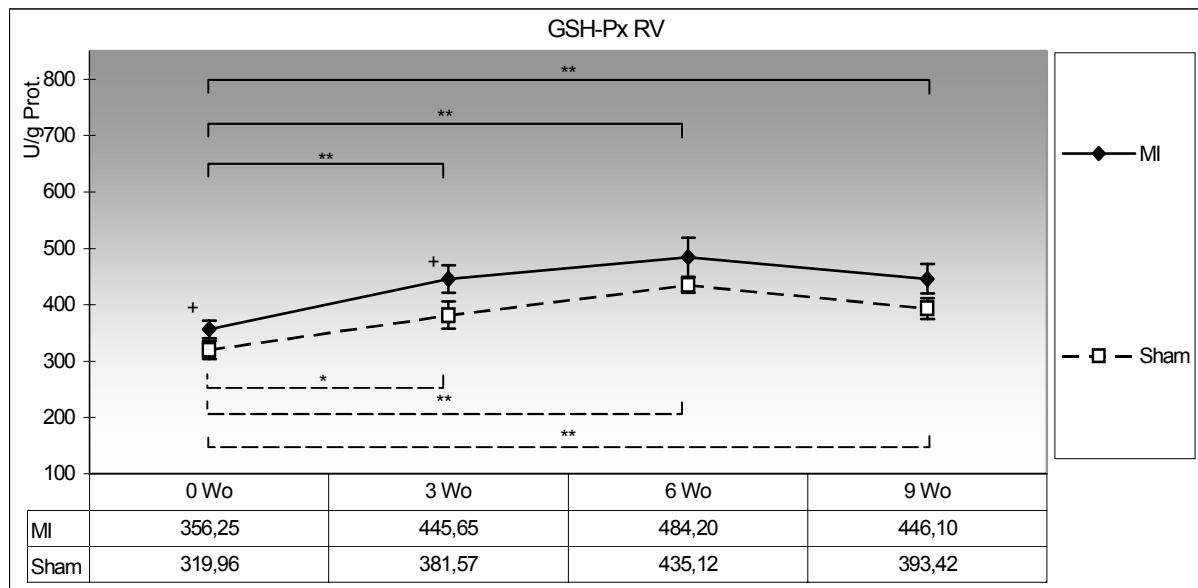


Abbildung 40: *GSH-Px-Aktivitäten im rechten Ventrikel (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p<0,1$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$*

In der Akutphase liegt die SOD-Aktivität im linken ($p<0.1$) und im rechten ($p<0.01$) Ventrikel der infarzierten Tiere jeweils über denen der scheinoperierten Tiere. Nachfolgend verminderte sich die SOD-Aktivität wieder, so dass 3 Wochen nach MI keine Aktivitätsunterschiede zu den scheinoperierten Tieren existieren (Abbildung 41 und 42).

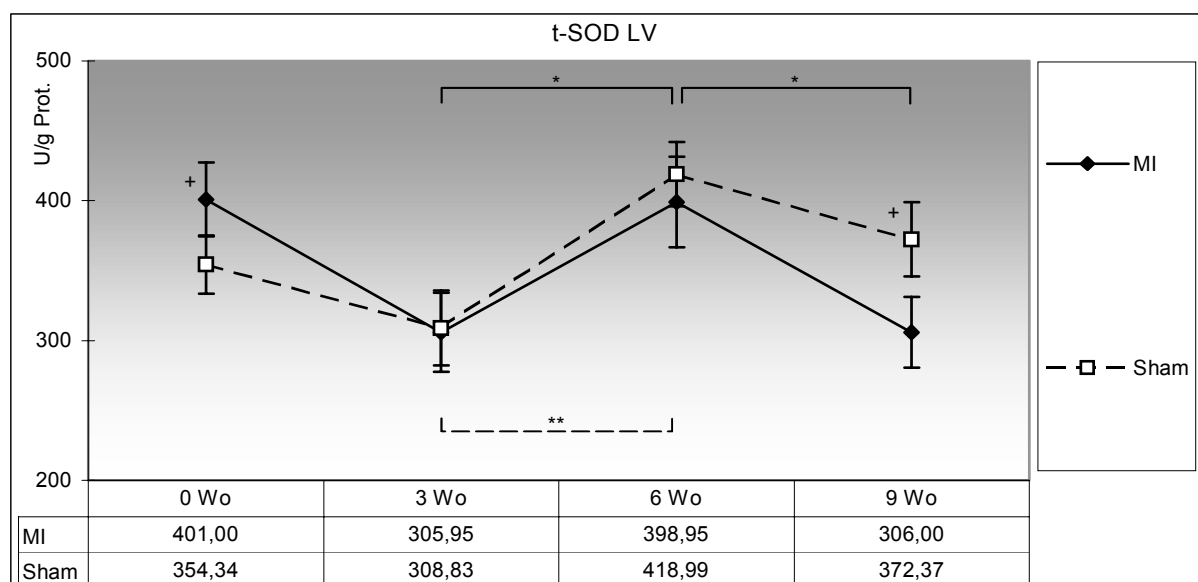


Abbildung 41: *Gesamt-SOD im linken Ventrikel (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p<0,1$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$*

Postakut stieg die Gesamt-SOD-Aktivität zunächst im linken Ventrikel der MI-Tiere von der 3. zur 6. Woche an, danach sank sie signifikant ab. Dieser Abfall fiel bei den Kontrollen geringer aus. Daraus ergab sich für die Infarkt-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen eine durch Borderline-Signifikanz gekennzeichnete niedrigere Gesamt-SOD-Aktivität 9 Wochen nach Infarkt (Abbildung 41).

In der postakuten Phase ließen sich für den rechten Ventrikel sowohl der MI-Tiere als auch der Kontrollen keine signifikanten Gesamt-SOD-Aktivitätsänderungen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer nachweisen (Abbildung 42).

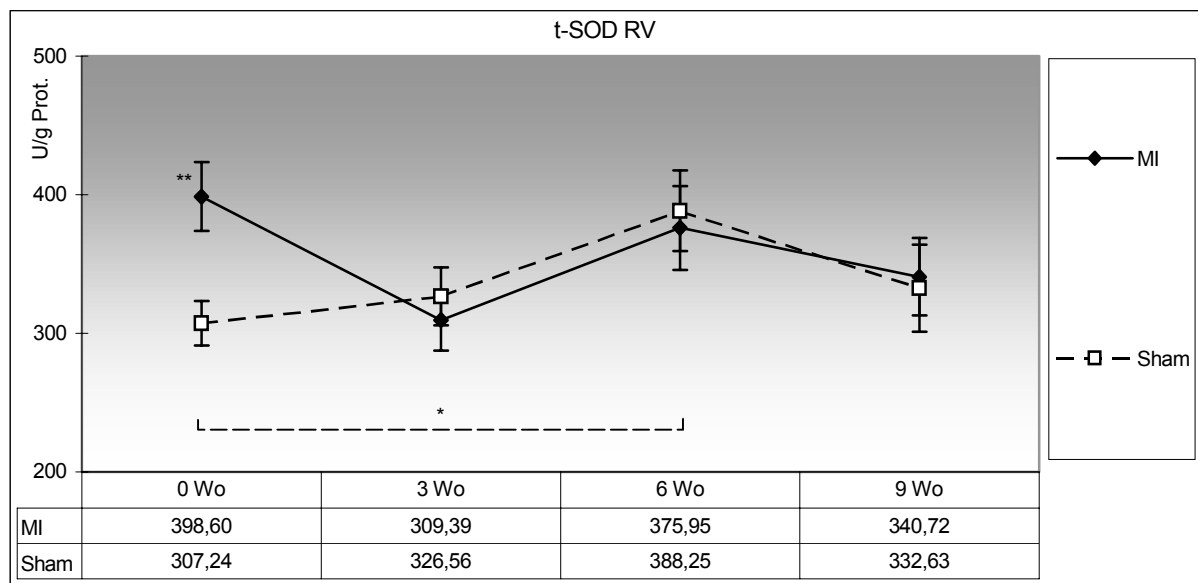


Abbildung 42: Gesamt-SOD im rechten Ventrikel (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Wie die Abbildungen 43 und 44 zeigen, scheinen die Aktivitätsänderungen der CuZn-SOD für den zeitabhängigen Verlauf der Gesamt-SOD-Aktivität verantwortlich zu sein. Es kommt ausgehend von den, ähnlich der Gesamt-SOD erhöhten Werten in der MI-Gruppe (mit Borderline-Signifikanz im rechten Ventrikel verglichen mit den Kontrollen) zu einem Abfall der Aktivität nach 3 Wochen und einem neuerlichen Anstieg nach 6 Wochen, signifikant dabei nur im linken Ventrikel.

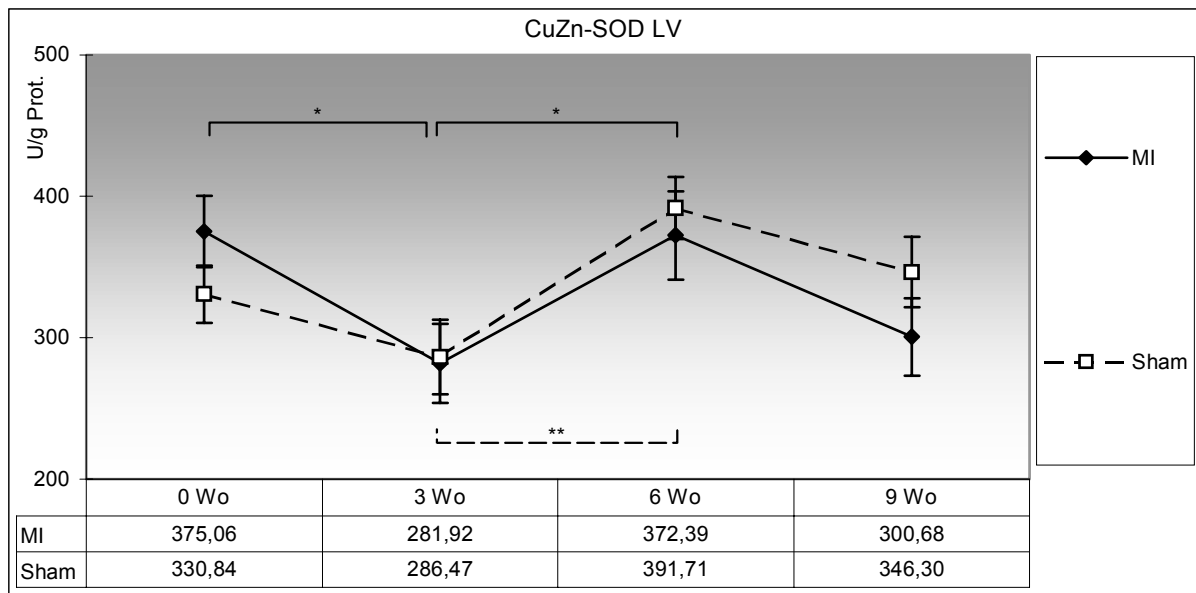


Abbildung 43: CuZn-SOD im linken Ventrikel (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

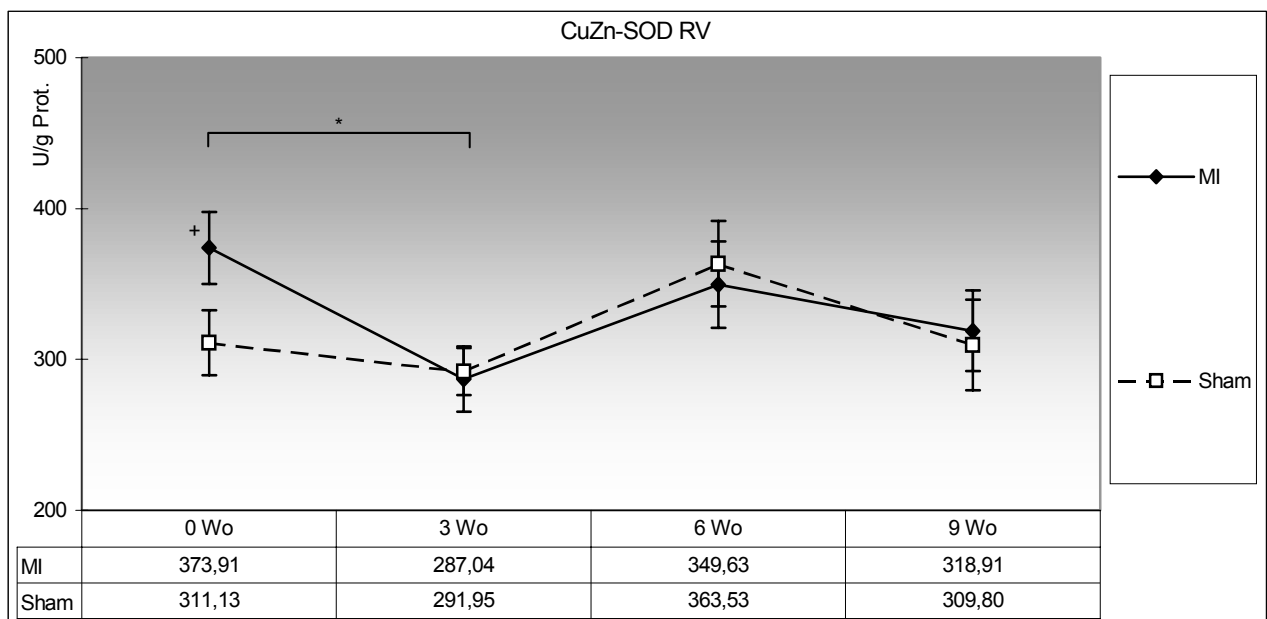


Abbildung 44: CuZn-SOD im rechten Ventrikel (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p < 0,1$; * $p < 0,05$

Bei den Mn-SOD-Aktivität wurden weder gruppen- noch zeitabhängige Unterschiede beobachtet.

5.2.5. Lipidperoxidation

Während der akuten Myokardinfarktphase (14-16 h nach Ligatur) wurden sowohl im linken als auch rechten Ventrikel der infarzierten Tiere, im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren, keine erhöhten TBARS-Konzentrationen gefunden (Abbildung 45 und 46). Auch beim Vergleich zur Situation nach 3 Wochen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

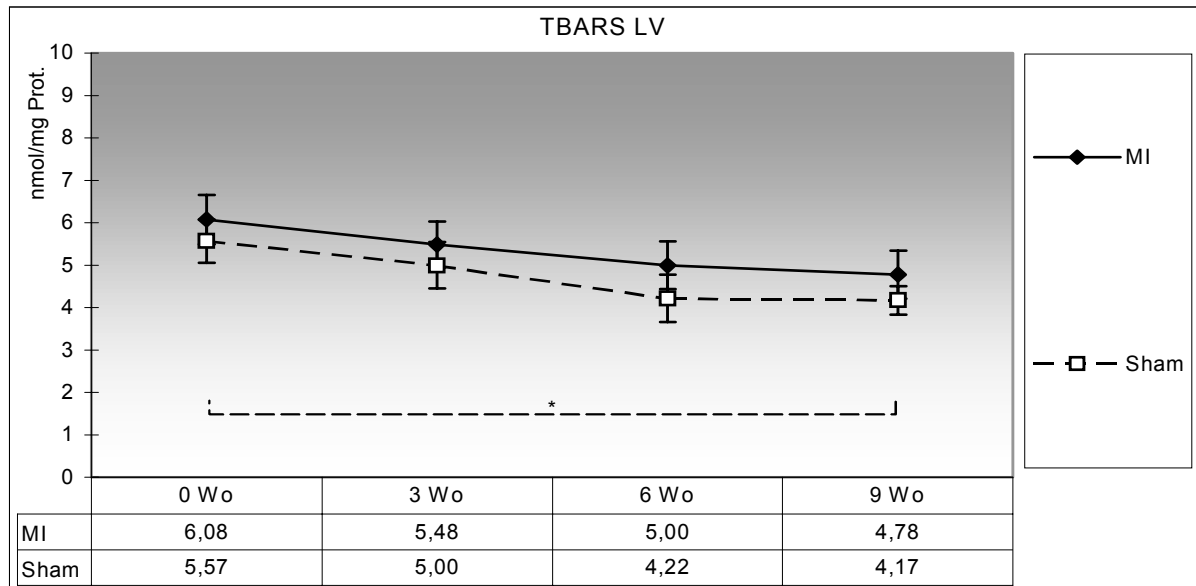


Abbildung 45: Gehalt an TBARS in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$

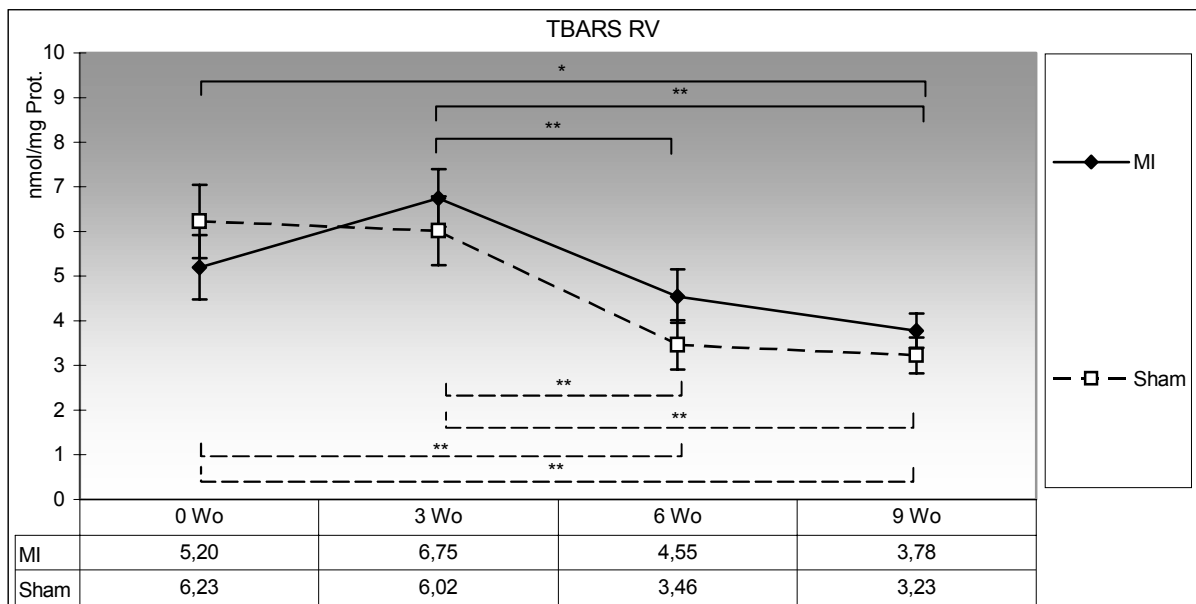


Abbildung 46: Gehalt an TBARS in den rechten Ventrikeln (RV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Im Verlauf der Post-Infarktphase ließen sich bei den MI-Tieren im linken Ventrikel keine signifikanten Veränderungen in der TBARS-Konzentration nachweisen, wohingegen die

Konzentration der Lipidperoxidationsprodukte im rechten Ventrikel zwischen der 3. und 6. bzw. 9. Woche signifikant absinkt. Bei den scheinoperierten Tieren wurde der zeitabhängige Abfall in der TBARS-Konzentration in beiden Ventrikeln beobachtet.

5.2.6. Stressproteine

In den rechten Ventrikeln von Infarkt- und scheinoperierten Tieren wurde zu keinem Zeitpunkt nach MI eine signifikant verschiedene Hsp25- und 72-Konzentration beobachtet. Dagegen zeigen die Abbildungen 47 und 48 für den linken Ventrikel in der akuten Infarktphase (14-16h nach MI) in der Tendenz ($p < 0.1$) höhere Hsp25 und 72-Konzentration in den MI-Tieren verglichen mit den scheinoperierten Kontrollen. Nach 3 Wochen sind vergleichbare Unterschiede zwischen Infarkt- und scheinoperierten Tieren in den linken Ventrikeln nicht mehr zu beobachten. Daraus ergab sich ein signifikanter Abfall ($p < 0.05$) von Hsp25 und 72 in der Infarkt-Gruppe zur 3. Woche hin.

Postakut steigen ab der 3. Woche die Hsp25- und Hsp72-Konzentrationen in den linken Ventrikeln der infarzierten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen an, so dass für Hsp25 zwischen der 3. und 9. Woche und für Hsp72 zwischen der 3 und 6 bzw. 9 Woche eine signifikante Konzentrationszunahme statistisch gesichert werden konnte.

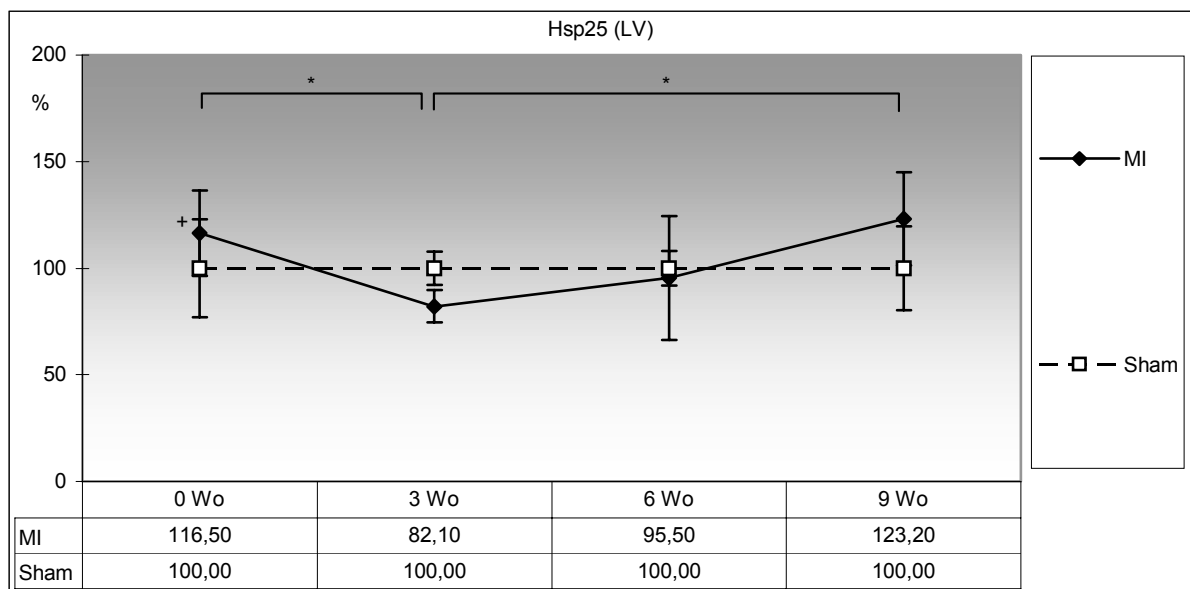


Abbildung 47: Hsp25-Konzentrationen in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p < 0,1$, * $p < 0,05$

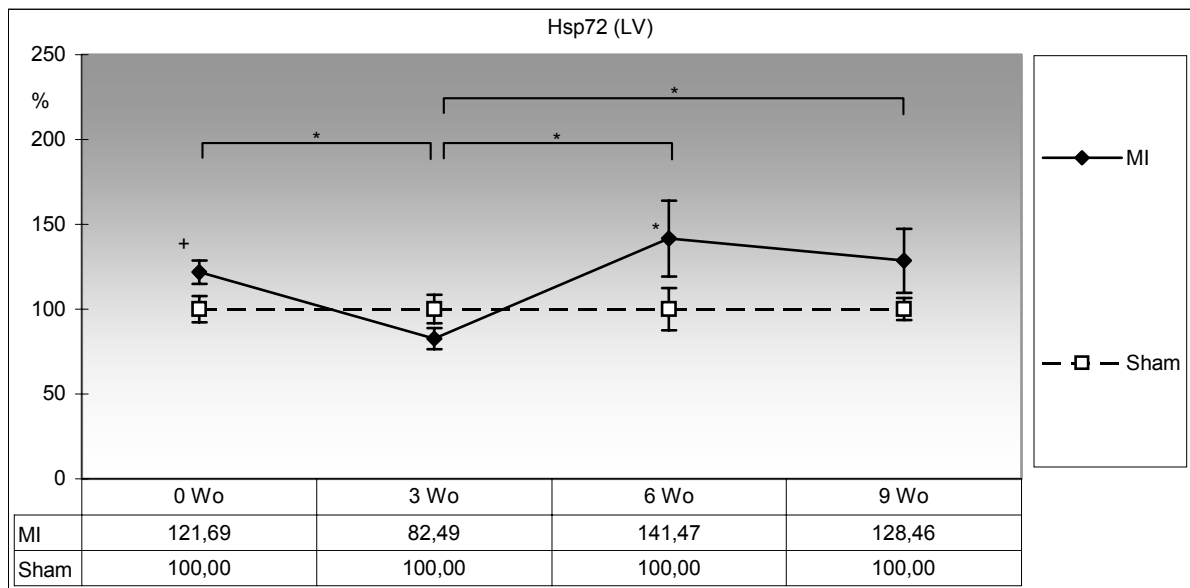


Abbildung 48: *Hsp72-Konzentrationen in den linken Ventrikeln (LV) der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$*

In den Abbildungen 49 und 50 sind die Hsp-Konzentrationen im Papillarmuskel dargestellt. Es zeigte sich für die MI-Tiere prinzipiell ein dem linken Ventrikel vergleichbares, für die Akutphase jedoch deutlicher ausgeprägtes Verhalten von Hsp25 und 72. Bereits 14-16 h nach MI sind Hsp25 und 72, verglichen mit den scheineroperierten Tieren, im Papillarmuskel signifikant erhöht. Hsp25 vermindert sich anschließend ($p < 0,01$), so dass sich MI- und scheineroperierte Tiere 3 Wochen nach OP nicht mehr unterscheiden. Mit Borderline-Signifikanz ($p < 0,1$) nahm auch die Hsp72 Konzentration im Papillarmuskel in den MI-Tieren zur 3. Woche hin ab. Dennoch existierten nach 3 Wochen noch signifikant höhere Hsp72-Konzentrationen im Papillarmuskel der Infarkt-Tiere verglichen mit den scheineroperierten Kontrollen.

Hsp25 stieg, wie schon für den linken Ventrikel gezeigt, in der Postakutphase wieder an ($p < 0,01$), so dass im Papillarmuskel der MI-Tiere nach 6 Wochen im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollen Hsp25 signifikant erhöht war. Aus den Mittelwerten der MI-Tiere 3 und 6 Wochen nach OP kann auch für Hsp72 ein Anstieg vermutet werden, der sich auf Grund der großen Streuung der Hsp72-Konzentrationen nach 6 Wochen jedoch nicht statistisch sicher ließ. Im Vergleich zu den altersgerechten Kontrollen wiesen die Infarkt-Tiere 6 Wochen nach MI signifikant höhere Hsp72-Konzentrationen auf. Nach 9 Wochen waren für beide Stressproteine keine Unterschiede zu den scheineroperierten Kontrollen mehr nachweisbar. Dieser Befund gemeinsam mit dem Vergleich der Mittelwerte der MI-Tiere 6 und 9 Wochen nach Operation lässt auf einen Abfall der Hsp-Konzentrationen zwischen der 6. und 9. Woche schließen.

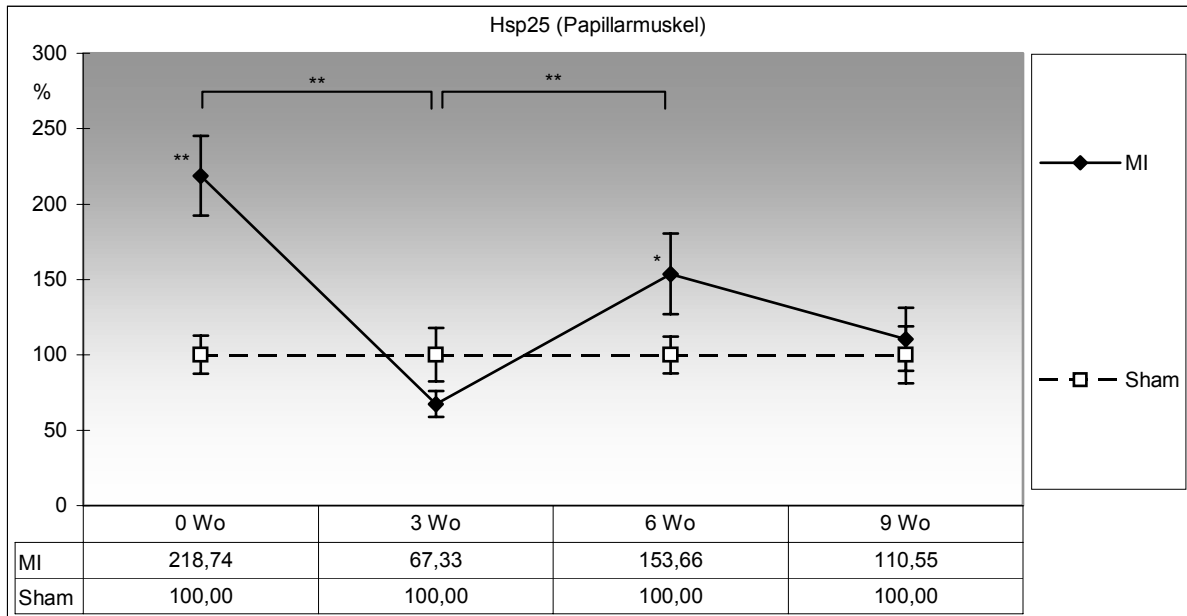


Abbildung 49: Hsp25-Konzentrationen im Papillarmuskel der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

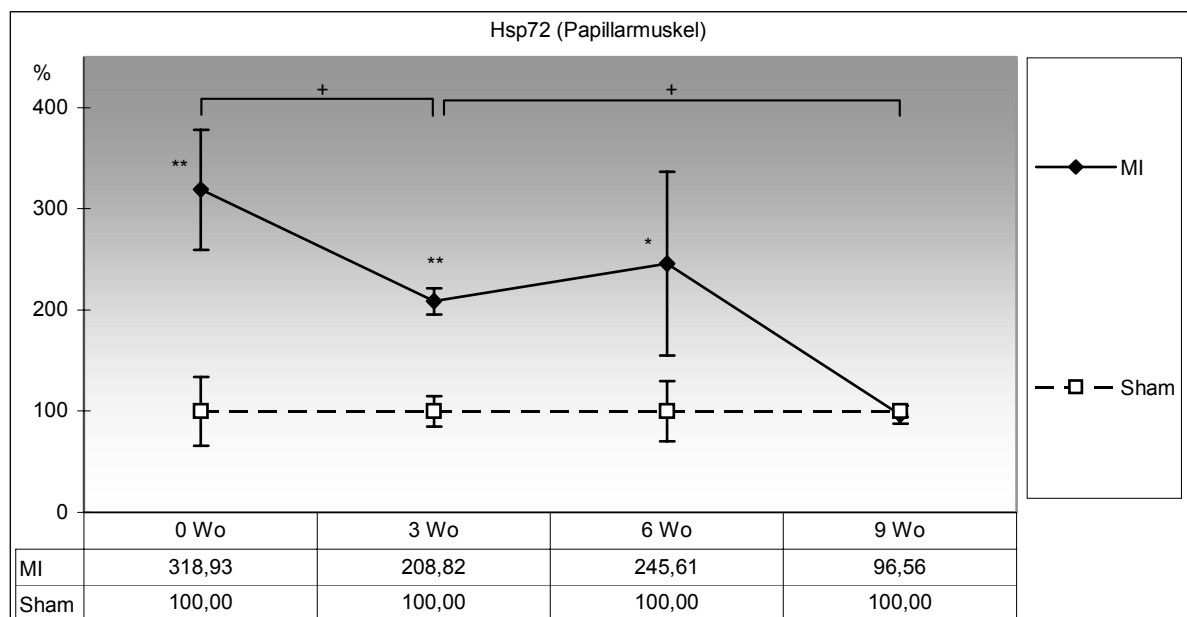


Abbildung 50: Hsp72-Konzentrationen im Papillarmuskel der infarzierten Herzen (MI) und der Kontrollgruppe (Sham); + $p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.2.7. Funktionelle Parameter zur Charakterisierung der Herzleistung

Die maximale Kraftamplitude PF (Abbildung 51) fiel bei Einsetzen der Hypoxie in allen Gruppen vergleichbar schnell ab und erreichte nach 20 min Hypoxiedauer ca. 10% des normoxischen Kontrollwertes wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen der MI- und Sham-Gruppe auftraten. Während der nachfolgenden Reoxygenierung fand in allen Gruppen ein vergleichbarer kontinuierlicher Wiederanstieg der PF statt. Es kam nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen MI- und Sham-Tieren. In der Akutphase nach OP (14-16h) wurden in beiden Gruppen am Ende der Reoxygenierung lediglich etwa 40-50% des normoxischen Kontrollwertes erreicht, während es zu den späteren Zeitpunkten 60-80% waren. Die auf die PF normierte maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ($(dF/dt_{\max})/PF$) (Abbildung 52) nahm während der Hypoxiephase zu, was bedeutet, dass PF stärker abnahm als die zugehörige Kontraktionsgeschwindigkeit. In der Phase der Reoxygenierung war in allen Gruppen nach einem schneller Abfall von $(dF/dt_{\max})/PF$ ein langsamer Wiederanstieg zu beobachten, der bedeutet, dass eine Zunahme der Kontraktionsrate vorlag, die die Zunahme der PF überstieg. Lediglich am ersten Tag nach MI war die Kontraktion deutlich weniger verlangsamt. Hier blieb die Kontraktion dann auch in der zweiten Phase des Wiederanstiegs der $(dF/dt_{\max})/PF$ signifikant schneller im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen. Zu den späteren Zeitpunkten nach MI war der Verlauf in beiden Gruppen ähnlich. Die Abnahme der $(dF/dt_{\min})/PF$ (Abbildung 53) in Hypoxie kommt durch eine die Abnahme der PF übertreffende Abnahme der Relaxationsrate zustande. Dies war bei den scheinoperierten Tieren immer der Fall, bei den MI-Tieren deutlich nur in der Akutphase (14-16h) nach Infarkt. Nach 9 Wochen war die $(dF/dt_{\min})/PF$ bei den Infarkt-Tieren am Ende der Hypoxie signifikant größer als bei den Sham, was für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber hypoxischen Einflüssen spricht. Die Reoxygenierung löste in allen Gruppen eine stark verlangsamte Relaxation aus, von der aus eine langsame Erholung stattfand. Der deutliche Anstieg der $(dF/dt_{\min})/PF$ während der Reoxygenierung entsteht durch eine die Zunahme der PF übertreffende Zunahme der Relaxationsrate. Die akut nach Infarkt entnommenen Papillarmuskeln erholten sich deutlich früher als die der entsprechenden Kontrollen und relaxierten bis zum Ende der Reoxygenierung signifikant schneller. Insgesamt konnte im folgenden Zeitverlauf (3, 6, 9 Wochen) bei den MI-Tieren eine stetige Annäherung an die vollständige Wiederherstellung (1,0) beobachtet werden. Dadurch entwickelte sich ein zunehmender Unterschied zwischen MI-Tieren und Sham (signifikant nach 6 und 9 Wochen).

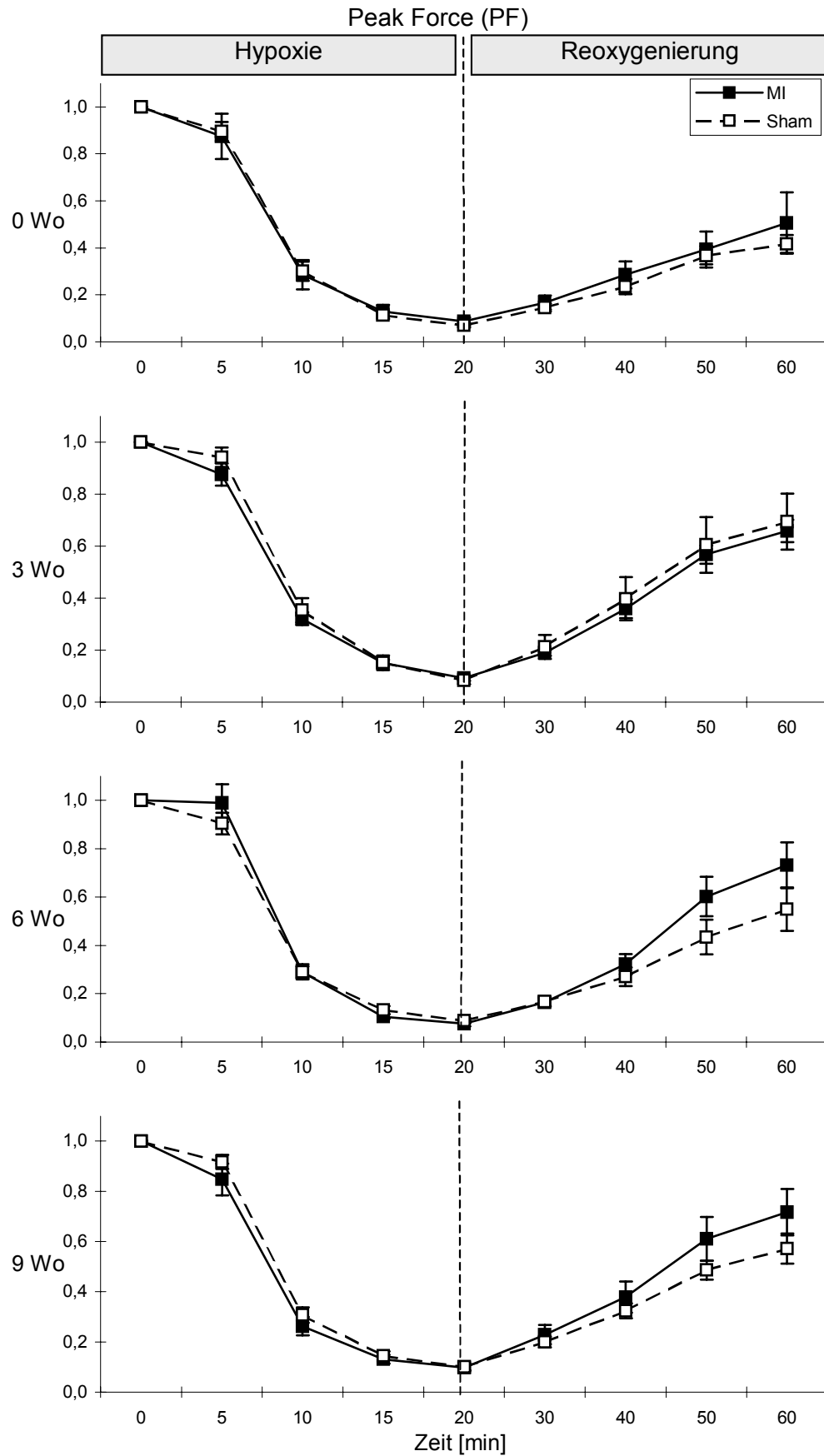


Abbildung 51: Peak force (PF) der Papillarmuskeln von MI und Sham 0-9 Wochen nach OP während Hypoxie und Reoxygenierung.

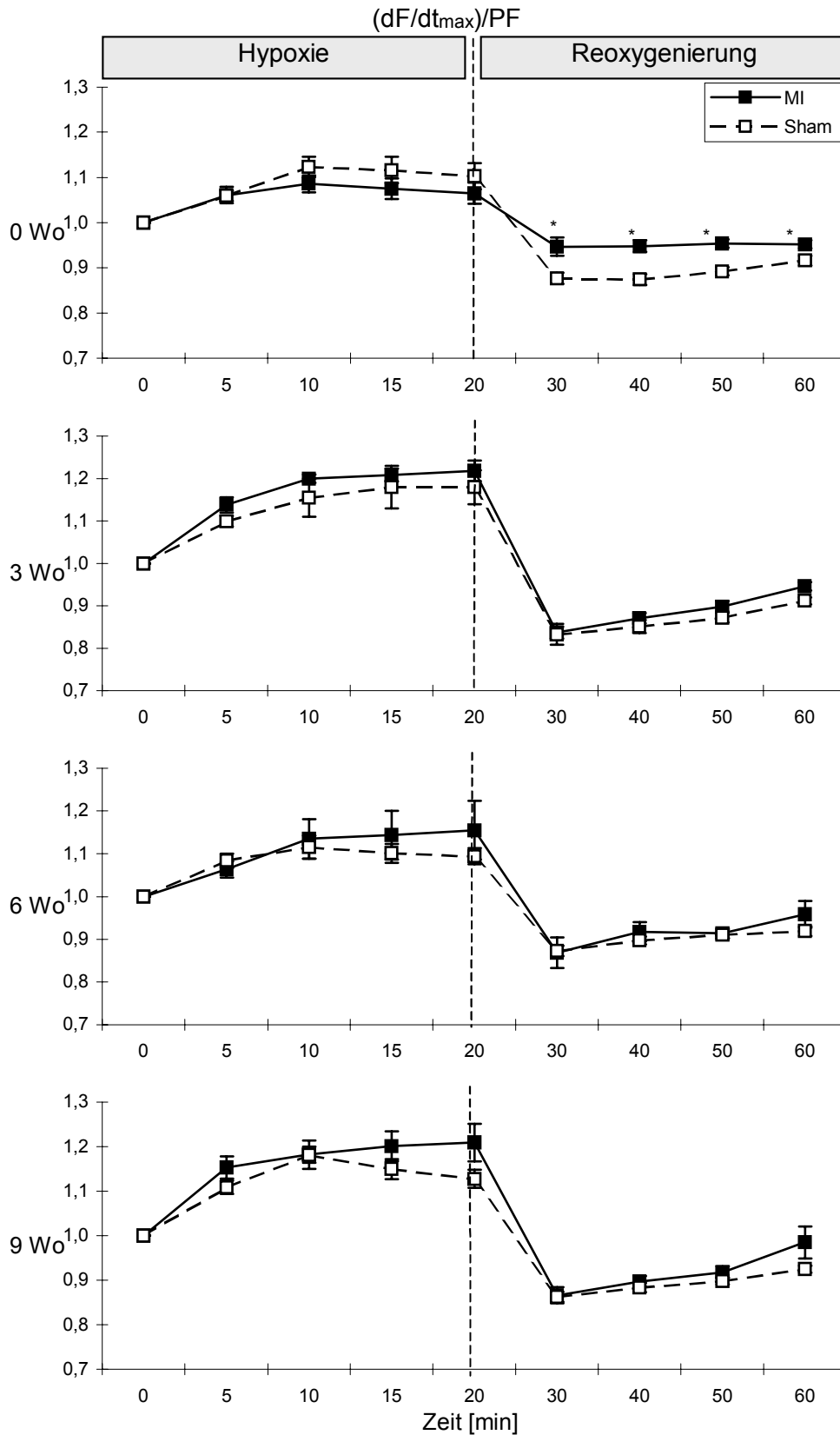


Abbildung 52: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit normiert auf PF ($(dF/dt_{\max})/PF$) der Papillarmuskeln von MI und Sham 0-9 Wochen nach OP während Hypoxie und Reoxygenierung. * $p < 0,05$

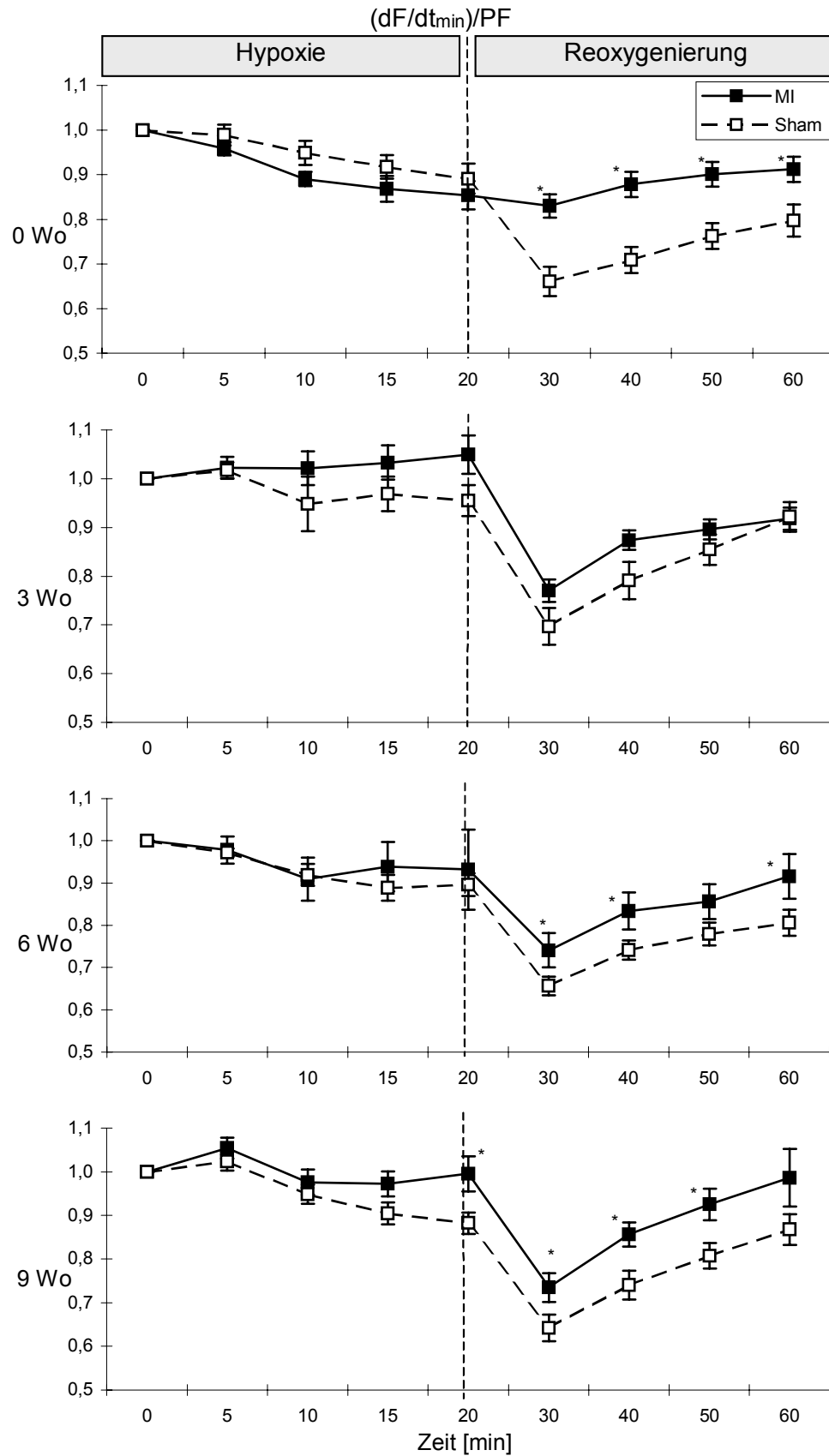


Abbildung 53: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit normiert auf PF ($(dF/dt_{\min})/PF$) der Papillarmuskeln von MI und Sham 0-9 Wochen nach OP während Hypoxie und Reoxygenierung. * $p < 0,05$

6. DISKUSSION

Ein zentrales Ereignis im Rahmen der Herzinsuffizienzgenese ist die Aktivierung von Kompensationsmechanismen, die - allerdings zeitlich begrenzt - eine Steigerung bzw. Stabilisierung der Herzleistung ermöglichen. Auf zellulärer Ebene werden dabei strukturelle und funktionelle Umbauprozesse im Myokard beobachtet, die - makroskopisch als Herzhypertrophie sichtbar - unter Myokardremodeling zusammengefasst werden. Bisher vorliegende tierexperimentelle Untersuchungen lassen vermuten, dass zum Myokardremodeling auch Veränderungen im enzymatischen antioxidativen Potential sowie im Hsp-System gehören. Dadurch sollte der Schutz des Herzens gegenüber der für die Herzinsuffizienz als typisch ausgewiesenen zunehmenden Sauerstoffradikal-induzierten Schädigung ermöglicht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit, werden die in zwei Rattenmodellen:

1. der Hypertonie-induzierte Herzinsuffizienz und
2. der Myokardinfarkt-induzierten Herzinsuffizienz,

beobachteten Veränderungen im antioxidativen System und im Hsp-System beschrieben, deren funktionelle Bedeutung dargestellt sowie die Assoziation zum Myokardremodeling, das parallel durch Hypertrophieparameter und Veränderungen im CK-Isoenzym-System charakterisiert wurde, diskutiert.

6.1. 1.Tiermodell: Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie bei transgenen Ratten (TGR)

Vor Eintritt der manifesten Herzinsuffizienz gilt Hypertrophie als Kompensationsmechanismus, dessen Aktivierung zu einem wesentlichen Teil auf die autokrin/parakrine Wirkung des Renin-Angiotensin-Systems zurückzuführen ist. Es ist mehrfach nachgewiesen worden, dass AngII direkt zur Hypertrophie von Kardiomyozyten führt [64,65]. Neuere Forschung in dieser Richtung ergaben, dass radikalische Sauerstoffverbindungen eine entscheidende Rolle bei der Gen-Induktion und nachfolgender Zell-Proliferation spielen [66]. Das zeigen auch die schon im Kapitel 2.1.1. beschriebenen Studien zur Ang II-induzierten Hypertrophie von Nakamura et al. [11]. Basierend auf diesen Versuchsergebnissen wird eine enge Assoziation von Hypertrophieentwicklung, Sauerstoffradikalbildungen und Induktion entsprechender Schutzsysteme (antioxidative Enzyme, Hsp) vermutet. Durch makroskopische (Hypertrophiemarker) und zelluläre (CK-Isoenzyimmuster) Beschreibung des Remodelingprozesses parallel zur Charak-

terisierung des Sauerstoffradikalstoffwechsels (Lipidperoxide, antioxidative Enzyme) und des Hsp-Systems ermöglichte uns das genutzte Tiermodell, die Expression von antioxidativen Enzymen und Stressproteinen erstmals als Folge einer „isolierten“ Aktivierung des RAS zu untersuchen und die Modulation antioxidativer Enzyme - speziell der GSH-Px - als eine von der Hypertrophieentwicklung weitgehend unabhängige Remodelingreaktion auszuweisen. Dagegen erscheinen Veränderungen im Hsp-System vor allem von Hsp25 eher Hypertrophie-assoziiert zu sein.

6.1.1. Herzhypertrophie bei TGR

Bei den TGR kam es, erkennbar an der Zunahme des Herzgewichtes im Vergleich mit der Kontrollgruppe zur Herzhypertrophie. Die nachgewiesene direkt wachstumsinduzierende Wirkung von AngII über den AT₁-Rezeptor könnte dafür verantwortlich sein [64]. Die Hypertrophie betraf jedoch isoliert den linken Ventrikel, wie durch die Hypertrophiemarker LV/KG und RV/KG ausgewiesen wurde. Bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) wurde ebenfalls eine linksventrikuläre Hypertrophie gefunden, deren RAS-Abhängigkeit sich durch Reduktion der linksventrikulären Masse nach ACE-Hemmung belegen ließ [67,68]. Das bestätigten auch Untersuchungen, die zeigten, dass eine signifikante Regression der Hypertonus-induzierten Hypertrophie nur durch Blutdrucknormalisierung mit ACE-Hemmern, nicht aber mit Sympatholytika oder Vasodilatoren erreicht wurde [69]. Warum, wie in unseren Untersuchungen gezeigt, der rechte Ventrikel nicht oder zumindest weniger auf die RAS-Aktivierung mit Hypertrophie reagiert, ist gegenwärtig unbekannt. Eine mögliche Erklärung wäre der isoliert im linken Ventrikel alternder Ratten gefundene höhere mRNA-Gehalt von Angiotensinogen und Angiotensin-Converting-Enzym [70], der demzufolge vor allem dort und weniger im rechten Ventrikel die Hypertrophie begünstigt.

6.1.2. CK-Remodeling bei TGR

Die Gesamt-CK Erniedrigung im linken, nicht aber im rechten Ventrikel der TGR weist auf die stärkere Schädigung des linken Ventrikels hin. Derartige, durch CK-Abfall demonstrierte, unterschiedliche Schädigungsmuster im linken und rechten Ventrikel sind auch in anderen Insuffizienzmodellen beobachtet worden. Laser et al. [71] zeigten in der chronischen Phase nach Myokardinfarkt eine Gesamt-CK Erniedrigung im intakten linken Ventrikel und Septum, nicht jedoch in anderen Herzbereichen. Auch im 2. Tiermodell dieser Arbeit fanden wir 9 Wochen nach MI eine Gesamt-CK Erniedrigung isoliert im linken Ventrikel.

Zum CK-Isoenzym-Shift zu höheren Anteilen an CK-MB und CK-BB kam es ebenfalls nur im linken Ventrikel der TGR. Die gesteigerte Expression fetaler Gene, die im Rahmen des Remodelings bekannt ist [12], könnte die gemeinsame Grundlage für Hypertrophie und Änderungen in der Expression von CK-Isoenzymen bilden. So verschob sich das CK-Isoenzymmuster im linken Ventrikel der TGR zu höheren Anteilen an den Isoenzymen die die „fetale“ B-Untereinheiten besitzen (CK-MB und CK-BB). Vergleichbare Ergebnisse erbrachten Studien an anderen Modellen, beispielsweise bei Myokardhypertrophie nach Infarkt [41] und Training [72]. Das weist auf eine enge Beziehung zwischen der Hypertrophieentwicklung, den damit verbundenen Stoffwechselbedingungen und den Umstellungen des Expressionsmusters der CK-Isoenzyme hin. Allerdings haben andere Studien gezeigt, dass auch im nichthypertrophierten rechten Ventrikel ein Anstieg der Isoenzyme mit B-Untereinheit beobachtet werden kann [71]. Da sich der CK-Isoenzym-Shift sowohl durch β -Blockade als auch durch ACE-Hemmung verhindern lässt [73], liegt es nahe, dass nicht einzelne Induktoren dafür in Frage kommen, sondern dass vielmehr ein multifaktorielles Geschehen im Rahmen der Hypertrophieentstehung vorliegt. Die beschriebene CK-MM Erniedrigung lässt sich in diesem Zusammenhang als relativer Verlust durch den gleichzeitigen Anstieg der Isoenzyme mit B-Untereinheit erklären. Da sich keine signifikante Verminderung der CK-Mi feststellen ließ, die als Marker für einsetzende Dekompensation mit konsekutivem Pumpversagen angesehen wird [74], kann davon ausgegangen werden, dass sich in der vorliegenden Studie die TGR im Stadium der kardialen Hypertrophie ohne relevante Insuffizienz befanden. Vergleichbare Verschiebungen des CK-Isoenzymusters zu höheren Anteilen an Isoenzymen mit B-Untereinheiten, ohne dass typische Veränderungen, die für eine dekompenzierte Insuffizienz sprechen, im Myokard vorliegen, wurden 3 Wochen nach Koronararterienokklusion an Hundeherzen gefunden [75]. Als physiologischer Vorteil der gesteigerten myokardialen Expression von CK-Isoenzymen mit B-Untereinheit wird die bessere Anpassung an partiell anaerobe Stoffwechselbedingungen angesehen. Durch sie kann aufgrund der in Kapitel 2.1.2.1. beschriebenen unterschiedlichen *Michaelis*-Konstanten -und der damit verbundenen höheren Affinität zu Creatinphosphat- der Phosphattransfer auf ADP unter Bildung von ATP begünstigt werden. Da es im TGR-Modell bei systemischer RAS-Aktivierung nur isoliert im linken Ventrikel zum Isoenzym-Shift der CK kam, kann eine alleinige Induktion dieser Veränderungen durch einzelne Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems ausgeschlossen werden.

6.1.3. Antioxidative Enzyme und Lipidperoxidation bei TGR

Im Kontrast zu den Hypertrophie-assoziierten und damit auf den linken Ventrikel begrenzten

Veränderungen im CK-System zeigen unsere Untersuchungen an den TGR eine Zunahme der GSH-Px im linken und auch im rechten Ventrikel, sowie im Papillarmuskel. Derartige GSH-Px-Zunahmen, die als Kompensationsmechanismus in Folge zunehmender Belastung des hypertrophierten bzw. insuffizienten Myokards durch oxidativen Stress angesehen werden, sind in unterschiedlichen Modellen beobachtet worden. So zeigten Gupta und Singal [40] nach 6, 12, 24 und 48 Wochen kardialer Hypertrophie durch „Aortenbanding“ bei Ratten eine GSH-Px-Erhöhung im hypertrophierten linken Ventrikel. Da sich in dieser Studie die Untersuchungen auf den linken Ventrikel beschränkten und aufgrund der Lokalisation der Aortenstenose auch eine erhöhte RAS-Aktivierung durch die minderperfundierten Nieren denkbar ist, können keine Aussagen hinsichtlich der Abgrenzung zwischen GSH-Px-Erhöhung aufgrund RAS-Aktivierung oder Hypertrophieebeneffekt abgeleitet werden. Ebenso beschränkten sich die Untersuchungen zum Übergang der kompensierten kardialen Hypertrophie in das Stadium der dekompensierten Herzinsuffizienz durch Dhalla und Singal [76] nur auf den linken Ventrikel. Dabei folgte auf einen erhöhten myokardialen GSH-Px-Gehalt im Stadium der Hypertrophie ein Absinken der GSH-Px-Aktivität im Verlauf der Dekompensation nach 20 Wochen. Die von uns beobachtete gesteigerte GSH-Px-Aktivität würde demnach darauf hinweisen, dass sich die TGR auch zum Zeitpunkt unserer Untersuchung im Stadium der kompensierten kardialen Hypertrophie befanden. Weiterhin lässt die GSH-Px-Erhöhung im rechten Ventrikel, ohne dass dieser hypertrophiert war, den Schluss zu, dass die Aktivitätserhöhung der GSH-Px keine allgemein Hypertrophie-assoziierte Reaktion ist, sondern dass Stoffwechselbedingungen, die als direkte Folge der RAS-Aktivierung gelten können, den Stimulus für die GSH-Px-Erhöhung darstellen. Gestützt wird diese Annahme auch dadurch, dass bei trainings-bedingter Hypertrophie in Albino-Ratten kein Anstieg der GSH-Px beschrieben wurde [77].

Für die Isoenzyme der SOD konnten signifikante Unterschiede weder zwischen den TGR und den normotensiven Kontrollen noch zwischen rechtem und linken Ventrikel nachgewiesen werden. Allerdings lagen die Mittelwerte bei den TGR sowohl im rechten als auch linken Ventrikel jeweils unter denen der Kontrollen. Dies scheint im Kontrast zu den Ergebnissen anderer Studien zu stehen. So zeigten sich im kompensatorisch hypertrophierten Ratten-Myokard nach Herzinfarkt [41] und bei kardialer Hypertrophie aufgrund exzessiven Trainings [77] SOD-Steigerungen. Andererseits berichteten Tokoro [78] und Ito [79] bei der nach der Ursache am ehesten vergleichbaren kardialen Hypertrophie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) von einer Verminderung des SOD Gehalts. Diese heterogenen SOD-Veränderungen in den verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen, die von adaptiver SOD-Zunahme über anschei-

nend „unbeeinflusste“ SOD-Aktivitäten bis hin zu SOD-Verlust reichen - wie tendenziell in dem von uns genutzten TGR-Modell beobachtet- müssen jedoch nicht unbedingt im Gegensatz zueinander stehen. Bereits die Untersuchungen von Dhalla et al. [76] haben gezeigt, dass mit zunehmender Insuffizienz im Rattenherz die Fähigkeit zur adaptiven SOD-Erhöhung verloren geht, so dass zeitabhängig im Anschluss an die Erhöhung der SOD-Aktivität ein Verlust eintritt, die den Übergang zur dekompensierten Herzinsuffizienz kennzeichnet. Es existiert also ein dynamischer Verlauf der SOD-Aktivitäten bei kardialer Hypertrophie. Entsprechend den Schlussfolgerungen von Dhalla et al. [76] kann aus unseren Ergebnissen abgeleitet werden, dass sich die TGR gerade in der Übergangsphase der beschriebenen SOD-Kinetik von initial kompensatorisch erhöhten Werten zu der, durch die Ausschöpfung der antioxidativen Kapazität bedingten, SOD-Erniedrigung befinden. Möglicherweise hätten wir bei der Wahl eines früheren Untersuchungszeitpunktes eine kompensatorische SOD-Zunahme beobachtet. Die Möglichkeit des Vorliegens nahezu „unbeeinflusster“ SOD-Aktivität neben gesteigerter GSH-Px-Aktivität, wie bei unseren TGR beobachtet, wurde auch in anderen Studien gezeigt, wo dies damit erklärt wird, dass die adaptive Potenz des Myokards zur GSH-Px-Steigerung im Vergleich zur SOD länger anhält und damit die GSH-Px-Zunahme als bedeutender für die Herzprotektion anzusehen ist [40]. Arbeiten zur essentiellen Hypertonie des Menschen unterstützen, dass die Ursache der - im Gegensatz zu anderen Studien - bei den TGR „unbeeinflussten“ SOD-Aktivität auch im „Hypertrophieauslöser“ chronische Hypertonie gesucht werden kann. Hier konnte eine Zunahme der GSH-Px und ein Abfall der SOD in den Erythrozyten im Vergleich zu normotensiven Patienten beobachtet werden [80]. Dies deutet gleichfalls auf eine vorrangige Bedeutung der GSH-Px in der Protektion gegenüber Sauerstoffradikal-induzierter Schädigung im Rahmen der kardialen Hypertrophie ausgelöst durch chronische Hypertonie hin. Um Klarheit über die Abhängigkeit/Unabhängigkeit der SOD von RAS-Aktivierung und/oder Hypertrophie zu erlangen, sollten anders konzipierte Studien folgen.

6.1.4. Hitzeschockproteine bei TGR

Hinsichtlich des Hsp72 wurde keine höhere Konzentration bei TGR im Vergleich zu WT beobachtet. Dies steht in Einklang mit den Untersuchungen von Comini et al. [81], die bei Herzinsuffizienz im Rattenmodell feststellten, dass im kompensierten Stadium der Herzinsuffizienz (reine Hypertrophie) das Myokard nicht durch erhöhte Hsp72-Konzentrationen gekennzeichnet ist, es bei manifester Herzinsuffizienz jedoch zu gesteigerter Hsp72-Expression kommt. Sie sehen in der Zunahme der Hsp72-Expression im Stadium der dekompensierten Herzinsuffizienz einen intrazellulären Adaptationsmechanismus zum Schutz beispielsweise

gegenüber Sauerstoffradikal-abhängiger Proteinschädigung. Es ist aber auch zu bedenken, dass chronisch hohe Hsp72-Konzentrationen im Rahmen von Autoimmunprozessen gebildet werden können [49]. In diesem Fall wäre die Hsp72-Expression an der Progredienz der Herzinsuffizienz beteiligt und könnte ein Marker für den Übergang zur Dekompensation sein. Danach würde die unveränderte Hsp72-Konzentration in unserem TGR-Modell (wie bereits aus den GSH-Px-Veränderungen abgeleitet) zum Untersuchungszeitpunkt auf eine kompensierte Herzinsuffizienz bei diesen Tieren hinweisen. Auch im menschlichen Myokard ist im Zustand der stabilen, kompensierten Herzleistung keine erhöhte myokardiale Hsp72-Konzentration nachweisbar [82].

Im Gegensatz zu Hsp72 fanden wir bei den TGR eine gesteigerte Hsp25-Konzentration im linken Ventrikel und im Papillarmuskel, nicht jedoch im rechten Ventrikel. Dies könnte auf eine Assoziation mit der Hypertrophie hinweisen. Hsp25 ist in den I-Banden zusammen mit dem Aktin lokalisiert und könnte aufgrund seiner Chapronwirkung die Myofilamente schützen, was seine gesteigerte Expression bei Hypertrophie erklären würde. Hsp25 verhindert dabei vermutlich die Aktin-Polymerisation bei der Einwirkung unterschiedlicher Noxen [83]. Nach einem Konzept von Dillmann [84] hat das Hsp25 einen protektiven Effekt gegenüber Hypoxie/Ischämie. Wie bereits diskutiert, kann die beobachtete Verschiebung des CK-Musters im linken Ventrikel als Zeichen für partielle Hypoxie/Ischämie angesehen werden, was damit die gesteigerte Hsp25-Expression isoliert im linken Ventrikel begünstigt. Der protektive Effekt der Gruppe der kleinen Hsp konnte nach Überexpression von Hsp25 im Rattenmodell anhand der Schutzwirkung gegenüber ischämischen Zellschäden gesichert werden [85]. Als Ursache für die Schutzwirkung von Hsp25 ist die schon mehrfach angesprochene Wechselwirkung mit dem Aktin der Myofibrillen anzunehmen. Darüber hinaus wurde auch über eine Erhöhung des antioxidativen Potentials durch das Hsp25 berichtet, einerseits durch Erhöhung des Gehaltes an reduziertem Glutathions (GSH), andererseits durch Neutralisation der toxischen Wirkung oxidierten Proteine [86, 87].

6.1.5. Ursachen für Hypertrophie, CK-Remodeling und Induktion von antioxidativen Enzymen und Hsp bei TGR

Auf welchem Weg die RAS-Aktivierung bei den TGR unabhängig von der Hypertrophieentwicklung zur Induktion von GSH-Px ist bisher nicht bekannt. Da jedoch die TBARS-Konzentration als Marker für das Ausmaß an oxidativem Stress sowohl im linken als auch im nichthypertrophierten rechten Ventrikel gesteigert war, könnte eine direkt mit der RAS-

Aktivierung verbundene Zunahme von oxidativem Stress den entscheidenden Stimulus darstellen. So haben Griendling et al. [88] and Mohazzab et al. [89] gezeigt, dass AngII die membranassoziierte NAD(P)H-abhängige Oxidase aktiviert, den wichtigsten vaskulären Sauerstoffradikalbildner. Neben dieser, direkt RAS-abhängigen Stimulation von oxidativem Stress bei den TGR, muß im linken Ventrikel, wo wir im Vergleich zum rechten Ventrikel signifikant höhere TBARS-Konzentrationen fanden, auch die Hypertrophie als begünstigend für den oxidativen Stress angesehen werden. Wie von Eichhorn et al. [8] zusammengefasst wurde, führen die größeren metabolischen Bedürfnisse und die zusätzlich verringerte Sauerstoffzufuhr aufgrund der Zunahme der Diffusionsstrecke durch Fibrose und Veränderung der koronaren Perfusion im hypertrophierten Ventrikel zu chronischer myokardialer Ischämie. Der CK-Isoenzym-Shift zu den fetalen B-Isoformen (CK-MB, -BB) - wie im linken Ventrikel der TGR-Tiere gezeigt - weist auf die chronisch-ischämischen Bedingungen im Myokard hin. Es ist heute gesichert, dass myokardiale Hypoxie/Ischämie mit einer vermehrten Bildung radikalischer Sauerstoffverbindungen einhergeht [90]. Cheng et al. [91] haben außerdem demonstriert, dass die Erhöhung der Wandspannung einzelner Papillarmuskeln von einer Zunahme der Sauerstoffradikalbildung begleitet ist. Dieses könnte auf zusätzlich gesteigerten oxidativen Stress als Folge der Hypertrophie-bedingten Zunahme der linksventrikulären Wandspannung hinweisen.

Dass der Vitamin E-Gehalt im Plasma der TGR erniedrigt war, deutet auf einen vermehrten Verbrauch des Radikalfängers in dieser Gruppe hin. Zum einen könnte der Effekt in der Hypertrophie begründet sein, die mit einer vermehrten Lipidperoxidation einhergeht; zum anderen ist auch die direkte AngII-Wirkung, die über vermehrte Sauerstoffradikalbildung vermittelt wird, als Ursache des vermehrten Tocopherolverbrauchs bei den transgenen Tieren denkbar. Für Letzteres spricht, dass auch im Plasma von SHR niedrigere Vitamin E-Konzentrationen gefunden wurden, die bei Behandlung durch ACE-Hemmung erhöht werden konnten [92]. Von Russo et al. [80] wurde auch im Plasma von Patienten mit essentieller Hypertonie eine verminderte Vitamin E-Konzentration bei erhöhten Lipidperoxidationsprodukten gefunden. Interessanterweise fiel in dieser Studie außerdem eine Zunahme der GSH-Px bei gleichzeitigem Abfall der SOD im Vergleich zu normotensiven Patienten auf. Dies zeigt einerseits, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Hypertonie einnimmt (möglicherweise als Signaltransduktion der RAS-Aktivierung) und andererseits, dass Vitamin E und GSH-Px als Antioxidantien bei Hypertonie eine größere Rolle zu spielen scheinen als die SOD.

6.1.6. Kardiale Funktion bei TGR

Um den Einfluss der oben angeführten biochemischen Veränderungen auf die funktionelle Herzleistung zu überprüfen, wurden Untersuchungen zur Kontraktionsfunktion der Papillarmuskeln unter Hypoxie/Reoxygenierungsstress durchgeführt. Um die Messungen der funktionellen Parameter am Papillarmuskel auf die biochemischen Veränderungen im Ventrikelmyokard bezogen diskutieren zu können, wurden zusätzlich die GSH-Px-Aktivität und der Hsp-Status im Papillarmuskel bestimmt. Die gefundenen Veränderungen entsprachen weitestgehend den Ergebnissen des linken Ventrikels. Es zeigten sich unter aeroben Bedingungen zunächst keine Unterschiede zwischen TGR und WT. Unter Hypoxie war die PF in beiden Gruppen erwartungsgemäß stark erniedrigt, da es aufgrund des schnellen Verbrauchs energiereicher Phosphate zur Anhäufung von anorganischem Phosphat kam, mit nachfolgendem Abfall der Sensibilität der Myofilamente auf Ca^{2+} [93]. Die nachgewiesene Erhöhung der CK-MB- und CK-BB-Konzentrationen bei TGR bewirken eine schnellere Rephosphorylierung von ADP zu ATP, was zur insgesamt besseren Hypoxie-Resistenz beitragen könnte. Bei der nachfolgenden Reoxygenierung erfolgte die Erholung der PF nicht synchron zur pO_2 -Steigerung. Die Ursache der schnelleren Regeneration bei den transgenen Tieren ist in der geringeren Schädigung oder besseren Erholungsfähigkeit des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) zu suchen, welches als Hauptdeterminante in der Kontraktionsregulation im Rattenmyokard angesehen wird [94]. Da die Schädigung des SR, wie von Rowe et al. [95] bewiesen, in erster Linie auf die vermehrte Formation von Sauerstoffradikalen (z.B. H_2O_2) und deren Folgeprodukte (Lipidperoxide) zurückzuführen ist, könnten diese als Folge der gesteigerten GSH-Px-Aktivität besser metabolisiert werden, was die Myokardprotektion bei den TGR erklären würde. Auf die Möglichkeit des Hsp25, über Interaktionen mit dem Aktin der Myofibrillen, durch Erhöhung des nichtenzymatischen antioxidativen Potentials (GSH) und durch die Metabolisierung oxidierter Proteine protektiv im Myokard zu wirken [86, 87], wurde bereits hingewiesen. Vermutlich wirken beide Systeme synergistisch bezüglich der insgesamt besseren Hypoxie/Reoxygenierungsresistenz bei den TGR.

6.2. 2. Tiermodell: Myokardinfarkt-induzierte Herzhypertrophie bei Ratten

Es ist heute allgemein akzeptiert, dass es in der akuten Phase des Myokardinfarktes zur gesteigerten Bildung von Sauerstoffradikalen kommt, deren Reaktionen mit Biomolekülen wesentlich zur strukturellen und funktionellen Myokardschädigung beitragen (siehe Kapitel 2 Theoretische Grundlagen). Als Folge der myokardialen Dysfunktion werden Kompensationsmechanismen aktiviert, deren Ziel die Stabilisierung der Herzleistung ist. Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei der Aktivitätssteigerung des neuronal/autokrin-parakrinen Systems und dabei insbesondere des adrenergen Systems und Renin-Angiotensin-Systems zu. Die Aktivierung beider Systeme und die als Folge einsetzende Herzhypertrophie führt jedoch zu weiterer und jetzt chronischer Steigerung der Sauerstoffradikalbildung. Theres et. al. [96] hat Mechanismen, die nach Aktivierung des adrenergen Systems und Renin-Angiotensin-Systems zur Bildung von Sauerstoffradikalen führen können, zusammenfassend dargestellt. Die so gebildeten Sauerstoffradikale spielen - wie bereits in Kapitel 6.1.1. ausgeführt - eine entscheidende Rolle beim Übergang von der kardialen Hypertrophie als kompensierte Phase im Verlauf der Herzinsuffizienzgenese zur dekompenzierten manifesten Herzinsuffizienz. Entsprechend dieser Hypothese von Singal und Kirshenbaum [50] besteht in der kompensierten Phase der Herzinsuffizienz trotz Aktivierung Sauerstoffradikal-bildender Mechanismen ein Gleichgewicht zwischen Radikal-Formation und Entgiftung. Die vermehrte Generierung radikalischer Sauerstoffverbindungen wird von Myokard durch eine Steigerung des endogenen enzymatischen antioxidativen Schutzsystems kompensiert. Diese kompensatorische Steigerung des antioxidativen Schutzes im Myokard ist jedoch begrenzt. Zeitabhängig oder als Folge zunehmender Intensität der Herzschiidigung entstehen Imbalancen in diesem Gleichgewicht von Radikalbildung und Inaktivierung. Dadurch kommt es zur oxidativen Schädigung und nachfolgend zur Dysfunktion des Myokards mit dem Übergang zur dekompenzierten Phase der Herzinsuffizienz. Um die Aktivitätskinetik des enzymatischen antioxidativen Systems und des Hsp-Systems - das als ein weiteres endogenes Protektionssystem im Rahmen der Herzinsuffizienzgenese von Bedeutung sein könnte - verfolgen zu können, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt die Aktivität des enzymatischen antioxidativen Systems, die Lipidperoxidation sowie der Gehalt an Hsp 25 und 72 gemessen und Parametern zur Charakterisierung der Herzhypertrophie und der kontraktiven Herzfunktion gegenübergestellt.

6.2.1. Akute Myokardinfarktphase (14-16 nach MI)

6.2.1.1. Hypertrophieparameter und Creatinkinase

Im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren ließen sich in der akuten Phase nach MI (14-16 h) keine Unterschiede im Körpergewicht, Gesamt-Ventrikelgewicht, links- und rechts-ventrikulären Gewicht und Hypertrophieindex nachweisen. Auch Veränderungen in der Gesamt-CK-Aktivität und im Isoenzymmuster waren 14-16 h nach MI im nichtinfarzierten Anteil des linken sowie des rechten Ventrikels nicht nachweisbar. Dies ist nicht überraschend, da CK-Verminderung während des akuten Myokardinfarkt hauptsächlich im infarzierten Gewebe bzw. in der "Borderline Zone" zu erwarten sind [97].

6.2.1.2. Lipidperoxidation und antioxidative Enzyme

Auch im Hinblick auf die TBARS-Konzentration als Marker für Lipidperoxidation ließen sich keine Unterschiede zwischen nichtinfarziertem Ventrikelgewebe der MI-Tiere und dem Myokard der Kontrollen aufzeigen. Das Auftreten vermehrter Lipidperoxidation in der akuten Phase nach MI wird auch vorrangig im infarzierten Gewebe und in der "Borderline-Zone" beschrieben [98]. Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die in der Akutphase nach experimentellem MI gesteigerte Lipidperoxidation im nichtinfarzierten Myokard aufgezeigt haben [99]. Möglicherweise sind unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte und Infarktgrößen die Ursachen für derartig unterschiedliche Resultate. Für die antioxidativen Enzyme und die Stressproteine haben wir nach MI im nichtinfarzierten Myokard deutliche Zunahmen gefunden. Während für den Infarktbereich in der Literatur ein Verlust an GSH-Px und SOD ausgewiesen wurde [98], fanden wir 14-16 h nach MI im nichtinfarzierten Teil des linken Ventrikels eine signifikant gesteigerte GSH-Px-Aktivität. Im rechten Ventrikel ist diese GSH-Px-Zunahme als Tendenz sichtbar. Begleitet ist die GSH-Px-Erhöhung von einer Steigerung der Gesamt-SOD-Aktivität, die jedoch im Kontrast zur GSH-Px eher den rechten Ventrikel betraf. Derartige Aktivitätserhöhungen im nichtinfarzierten Myokard in der akuten MI-Phase sind bisher nicht beschrieben worden. Denkbar ist, dass die Zunahme der Aktivität enzymatischer Antioxidantien als Kompensationsmechanismus anzusehen ist, den das überlebende Myokard im Verlauf des akuten MI aktiviert, um sich dadurch vor einer Ausweitung der im Infarktgebiet ablaufenden Sauerstoffradikal-abhängigen Schädigungsreaktionen zu schützen. Die deutlichere GSH-Px-Zunahme im linken Ventrikel im Vergleich zur t-SOD könnte ein weiteres Indiz für die postulierte hervorgehobene Funktion der GSH-Px in der Myokardprotektion un-

ter Bedingungen gesteigerten oxidativen Stresses sein [40]. Möglicherweise verhindert vor allem die GSH-Px-Steigerung die Lipidperoxidation im nichtinfarzierten Anteil des linken Ventrikels, wie wir dies anhand unveränderten TBARS-Konzentrationen verglichen mit den scheinoperierten Kontrollen ausgewiesen haben. Die Gesamt-SOD-Zunahme scheint sich unseren Befunden nach aus der CuZn-SOD-Zunahme zu ergeben. Ob dies auf eine größere myokardprotektive Bedeutung der CuZn-SOD im Vergleich zur Mn-SOD hinweist, ist gegenwärtig nicht zu entscheiden. Einerseits hat Siwik et al. [100] die CuZn-SOD als entscheidendes SOD-Isoenzym bei der Verhinderung der Hypertrophieinduktion durch radikalische Sauerstoffspezies ausgewiesen, andererseits wurde jedoch auch die Zunahme der Mn-SOD bei unbeeinflusster CuZnSOD-Aktivität nach Einwirkung von oxidativem Stress beschrieben [101].

6.2.1.3. *Hitzeschockproteine*

Mit der Induktion von Hitzeschockproteinen (Hsp) steht dem Herzmuskel ein weiterer endogener Schutzmechanismus zur Verfügung. Auf die Ursachen des protektiven Effektes von Hsp25 wurde schon eingegangen. Auch der protektive Effekt der Hsp72-Induktion auf die kontraktile Myokardfunktion konnte in zahlreichen Studien bewiesen werden, so beispielsweise für die Hitzeschock-induzierte Hsp72-Erhöhung beim Kaninchen [102] oder auch bei Überexpression von Hsp72 in transgenen Mäusen [103]. Die genauen Mechanismen der Protektion durch das Hsp72 sind zum jetzigen Zeitpunkt als spekulativ anzusehen. Sauerstoffradikale und die Ca^{2+} -Überladung des Sarkoplasmatischen Retikulums führen möglicherweise zu einem intrazellulären Milieu, dass zur Schädigung der Tertiärstruktur von Proteinen führt und auf diesem Weg zu funktionellen Veränderungen beiträgt. Hsp72 könnte diese Konformationsänderungen entweder verhindern, und/oder über gezielte Reparatur von geschädigten Proteinen durch die Chapronwirkung oxidative Schäden wieder beheben.

Im Rattenmyokard werden Hitzeschockproteine als Antwort auf kurzzeitige Ischämie aber auch auf permanente Koronarokklusion gebildet. Yu et al. [104] haben gezeigt, dass die Ligatur der linken Koronararterie 4 Stunden nach dem Ereignis ein Maximum an Hsp72 mRNA in der Ischämiezone erzeugte. Nur dort konnte nach 4 bis 24 Stunden immunhistochemisch Hsp72 nachgewiesen werden. Die gleichen Autoren haben auch 4 bis 24 h nach Ischämie/Reperfusionstress eine immunhistochemische Zunahme der Hsp72-Konzentration nachgewiesen. Kilgore et al. [105] konnten dagegen keine derartige akute Hsp72-Induktion zeigen, wohl aber 5-7 Tagen nach MI im nichtinfarzierten septalen Myokard. Weitere Belege für eine

Steigerung der Hsp72-Expression als Folge einer akuten Stresssituation für das Myokard liefern Untersuchungen, in denen nach akuter Druckbelastung von Rattenherzen durch *Aortenbanding* eine vorübergehende Zunahme der Hsp72-Expression beobachtet wurde [44]. Eine passagere Hsp72-Steigerung erfolgte auch nach kurzzeitiger mechanische Dilatation in isolierten Kaninchenherzen [106].

Wir fanden die stärkste Hsp72-Zunahme akut nach MI im Papillarmuskel, im nichtinfarzierten Areal des linken und rechten Ventrikels jedoch nur mäßig gesteigerte bzw. unveränderte Hsp72-Konzentration. Dieses regional unterschiedlichen Expressionsmuster 14 bis 16 Stunden nach MI könnten auf der Grundlage der engen Beziehung zwischen Ischämie und Hsp72-Expression erklärt werden [104]. Wir gehen davon aus, dass eine Minderperfusion bzw. "Borderline-Ischämie" im Papillarmuskel verantwortlich ist für die hohe Hsp72-Konzentration. Obwohl makroskopisch im Papillarmuskel keine Ischämie sichtbar war, ist eine Minderperfusion und damit partielle Ischämie wahrscheinlich, da bei Nutzung des gleichen Infarktmodells [104] die Ursprungsregion der Papillarmuskeln im linken Ventrikel als ischämisch ausgewiesen wurde. In den Gebieten, aus denen die Proben zur Analyse der Verhältnisse im rechten und linken Ventrikel entnommen wurden waren jedoch keine Zeichen für Ischämie beschrieben. Über welchen genauen Mechanismus die Hsp72-Induktion erfolgt ist nur teilweise bekannt. Belegen lässt sich eine Verbindung zwischen Hsp72-Induktion und Proteinkinase A- und C-Aktivierung [107].

Bislang lagen keine Daten zur myokardialen Hsp25-Expression während eines akuten Infarkts vor. Lediglich erhöhte Hsp27-mRNA nach kurzzeitiger Koronarokklusion und Reperfusion am Schweineherzen konnten nachgewiesen werden, jedoch ohne nachfolgende Steigerung des Hsp27-Proteingehalts [108]. Andererseits lösten in der Ratte sowohl akute renale Ischämie als auch lokaler Ischämie im Gehirn die Expression von Hsp25 aus. Wir haben nun parallel zur gesteigerten Hsp72-Expression auch eine Expressionssteigerung für Hsp25 im Papillarmuskel in der akuten Myokardinfarktphase beobachtet. Wie für Hsp72 zuvor beschrieben, war die Hsp25-Expression im nichtinfarzierten linken Ventrikel im Vergleich zum Papillarmuskel geringer. Die im Papillarmuskel initial sehr hohe Hsp25-Konzentrationen lässt sich auch auf die ischämischen Bedingungen in dieser Region zurückführen, da gerade die Lokalisation des Hsp25 in den I-Banden als wesentlich für den protektiven Effekt von Hsp25 im Rahmen ischämische Vorgänge im Myokard angesehen wird [47].

6.2.1.4. Kontraktile Funktion

Dass die von uns beobachtete myokardiale Zunahme von enzymatischen Antioxidantien und Stressproteinen nach experimentellem MI als eine Selbstprotektion des Myokards angesehen werden kann, konnte durch Hypoxie/Reperfusionsexperimente an den Papillarmuskeln bestätigt werden. Der protektive Effekt betraf vor allem die Reperfusionsphase. Unter Hypoxie zeigten sowohl die MI-Tiere als auch die Kontrollen ein vergleichbares Schädigungsmuster, sichtbar am Abfall der PF und $(dF/dt_{\min})/PF$. Als Ursache kann der Abfall der Ca^{2+} -Sensibilität der Myofilamente aufgrund des raschen Abbaus energiereicher Phosphate zu anorganischem Phosphat [93] angesehen werden. Während der Reoxygenierungsphase konnten wir dagegen bei den MI-Tieren eine bessere Wiederherstellung der kontraktile Funktion als Zeichen geringerer Schädigung durch den Hypoxie/Reoxygenierungszyklus ausmachen. Sichtbar wurde dies anhand höherer $(dF/dt_{\max})/PF$ und $(dF/dt_{\min})/PF$ in den MI-Tieren verglichen mit den Kontrollen. Da die Schädigung des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) durch reaktive Sauerstoffspezies als eine entscheidende Determinante für die Einschränkung der kontraktile Funktion angesehen wird [95], vermuten wir, dass die von uns gefundenen Zunahme von antioxidativen Enzymen und Stressproteinen nach MI einen besseren Schutz des SR gegenüber Schädigung durch Sauerstoffradikal-abhängige Reaktionen ermöglicht. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die verbesserte Wiederherstellung von $(dF/dt_{\min})/PF$ eng an die gesteigerten myokardialen GSH-Px-Aktivitäten und Hsp25-Konzentrationen gebunden ist.

Ein ausgeprägter protektiver Effekt der GSH-Px auf die kardiale Funktion konnte auch schon in anderen Modellen gezeigt werden. So wurde beispielsweise bei Gene-Knockout-Mäusen, die nur zu insuffizienter GSH-Px Produktion fähig waren eine verringerte Ischämie-Reperfusionstoleranz bei vermehrter Zellschädigung dokumentiert [109]. Auch war das Myokard transgener, GSH-Px-überexprimierender Mäuse resistenter gegenüber gleichartigem Stress [110]. Ähnlich der GSH-Px wurde auch für die SOD eine Protektion des Myokards gegenüber Ischämie/Reperfusion demonstriert [111]. Über mögliche Mechanismen zur Myokardprotektion durch Hitzeschockproteine ist schon berichtet worden.

6.2.2. Chronische Phase nach Myokardinfarkt (3-9 Wochen nach MI)

6.2.2.1. Hypertrophieparameter und Creatinkinase

Auch in der 3. Woche nach Infarkt ließen sich keine Unterschiede zu den Kontrollen hinsichtlich Körpergewicht, Herzgewicht, Ventrikelgewicht und Hypertrophieindex nachweisen. Ab der 6. postoperativen Woche konnte in der MI-Gruppe eine isoliert linksventrikuläre Hypertrophie nachgewiesen werden, die damit mit dem Ort der Schädigung identisch ist. Im rechten Ventrikel kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen Infarkt-Tieren und Kontrollen. Im Vergleich dazu haben Theres et al. [112] und Wagner et al. [41] 6 Wochen nach MI auch eine rechtsventrikuläre Hypertrophie beschrieben. Darüber hinaus war die linksventrikuläre Hypertrophie in diesen Studien erheblich stärker ausgeprägt als in unserer Untersuchung. So war das linksventrikuläre Gewicht im Verhältnis zum Körpergewicht (LVG/KG) 6 Wochen nach MI bei Theres et al. [96] um 21 % gegenüber den Kontrollen gesteigert, während in unserer Studie die Erhöhung mit 9% deutlich geringer ausfiel. Es wird angenommen, dass der Schweregrad der Hypertrophie eine wichtige Determinante ist, die den Übergang von der kompensierten kardialen Funktion zur funktionellen Dekompensation bestimmt [8]. Unsere Ergebnisse weisen auf eine vergleichsweise milde kardiale Hypertrophie 6 Wochen und auch noch 9 Wochen nach MI hin. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass sich die in unserer Studie untersuchten Tiere im Gegensatz zu anderen Studien auch 9 Wochen nach MI noch nicht im Zustand der kardialen Dekompensation befanden. Dies lässt sich auch mit dem Lungengewicht/Körpergewicht-Quotienten belegen, der zu keinem Zeitpunkt signifikant verschiedenen zwischen den Gruppen war. Damit bestand auch 9 Wochen nach MI keine Lungenstauung als Zeichen einer schweren myokardialen Insuffizienz.

Die zeitabhängigen Veränderungen der Creatinkinase-Aktivität in der chronischen Phase nach MI betrafen ausschließlich den durch Hypertrophie geprägten linken Ventrikel. Im rechten hypertrophiefreien Ventrikel wurde kein CK-Verlust beobachtet. Bereits in der 3. Postinfarkt-Woche fanden wir im linken Ventrikel der MI-Tiere eine Tendenz zur CK-Abnahme. Diese Abnahme ist aber erst nach neun Wochen signifikant. Damit weist auch diese Studie - wie wir dies schon anhand der TGR-Studie gezeigt haben - auf eine enge Beziehung von Hypertrophie und CK-Verlust hin. Allerdings war der linke Ventrikel bereits 6 Wochen nach MI hypertrophiert, die CK-Erniedrigung wurde jedoch erst nach 9 Wochen signifikant. Dies könnte darauf hinweisen, dass der CK-Verlust der Hypertrophieentwicklung folgt und den Zeitpunkt in der Herzinsuffizienzentwicklung dokumentiert - und möglicherweise auch kausal mitbe-

stimmt - zu dem das hypertrophierte Myokard in den Zustand der Dekompensation und damit manifesten Herzinsuffizienz übergeht. Dadurch werden auch Ergebnisse einer Untersuchung von Laser et al. [71] plausibel, in der trotz biventrikulärer Herzhypertrophie ein CK-Abfall nur isoliert im linken Ventrikel beobachtet wurde. Auch bei Untersuchung am Myokard von Patienten im Endstadium einer dilatativen Kardiomyopathie konnte für das humane Herz eine Verminderung der CK-Gesamt-Aktivität bei Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Diese Verminderung betraf sowohl den linken als auch rechten Ventrikel [14]. Obwohl in der Publikation nicht extra ausgewiesen, kann davon ausgegangen werden, dass beide Ventrikel hypertrophiert waren. Diese Beobachtungen am Menschen stützen unsere Hypothese, dass eine Gesamt-CK-Erniedrigung im hypertrophierten Myokard den Zeitpunkt markiert, zu dem das hypertrophe Herz in die dekompensierte Herzinsuffizienz übergeht. Häufig ist die CK-Erniedrigung mit einem CK-Mi-Verlust verbunden. Verschiedene Autoren haben über eine Abnahme der myokardialen CK-Mi und der CK-MM in der Postinfarktphase berichtet. Nach Ingwall [74] ist der CK-Mi-Verlust ein Zeichen für den Übergang von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es zu keiner absoluten CK-Mi-Erniedrigung kommt, sondern dass diese relativ - als Folge vermehrter Expression von CK-MB und CK-BB - entsteht [113].

Hinsichtlich des CK-Isoenzymmusters kam es in unserem Tiermodell ab der 3. Woche nach MI im linken, nicht aber im rechten Ventrikel zum Anstieg von CK-MB und CK-BB, der auch schon in anderen Studien nachgewiesen wurde [14, 15, 16]. Auch bei Wagner et al. [41] und Neubauer et al. [114] fanden sich 6 bzw. 8 Wochen nach MI im linken Ventrikel, vergleichbar mit unseren Ergebnissen nach 6 und 9 Wochen, ein Isoenzym-Shift zu erhöhter CK-MB und CK-BB. Im nichthypertrophierten rechten Ventrikel konnte in unseren Experimenten zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung des CK-Isoenzymmusters gefunden werden. Damit scheint eine sehr enge Beziehung zwischen Hypertrophie und CK-Isoenzym-Shift in Richtung auf gesteigerte Expression von CK-MB und CK-BB zu existieren. Unserer Studie nach wird dabei der CK-Isoenzym-Shift bereits zu einem Zeitpunkt (3 Wochen nach MI) sichtbar, zu dem die von uns genutzten relativ groben Parameter zur Hypertrophiecharakterisierung noch negativ waren. Da Laser et al. [71] nach MI eine biventrikuläre Hypertrophie fand, überrascht auch der von ihnen beobachtete CK-Isoenzym-Shift in beiden Ventrikeln nicht. Trotz des signifikanten Anstiegs von CK-MB und CK-BB konnten wir in unserem Infarktmodell die im Mittel niedrigeren CK-Mi-Aktivitäten in der Postinfarktphase nicht als signifikanten CK-Mi-Verlust sichern. Möglicherweise ist die im Vergleich zu anderen Studien [71, 115] geringere Zunahme von CK-MB und CK-BB die Ursache. Auch dies könnte ein

weiteres Zeichen für eine relativ milde Hypertrophie in unserem Modell sein.

Mögliche Ursachen für den Isoenzym-Shifts zu fetalen B-Untereinheiten im hypertrophierten Myokard sind bereits im Abschnitt zum CK-Isoenzym-Shift im TGR-Modell diskutiert worden. Aus der Beobachtung, dass die CK-Erniedrigung und der begleitende CK-Isoenzym-Shift durch β -Blocker-Gabe zu verhindern ist, wurde oft die Schlussfolgerung gezogen, dass ursächlich für diese CK-Veränderungen in erster Linie adrenerge Reize in Frage kommen. Die globale Wirkung adrenerger Reize würden die in unseren Experimenten beobachteten, lokalen CK-Veränderungen (isoliert im linken Ventrikel) allerdings nicht erklären, es sei denn man geht von einer unterschiedlichen Stimulierbarkeit von rechtem und linkem Ventrikel aus. Dergleichen konnte bei der ischämischer dilatativer Kardiomyopathie des Menschen, mit einer Verminderung der β -adrenergen Stimulationsfähigkeit des rechten Ventrikels, gefunden werden [116]. Die Hypothese der alleinigen adrenergen Initiation der CK-Veränderungen im hypertrophierten Myokard wurde allerdings 1995 durch Ishikawa et al. [117] dadurch entkräftet, dass sich die Veränderungen im CK-Isoenzymmuster auch durch ACE-Hemmer verhindern ließen. Da sich also nachgewiesenermaßen durch ACE-Hemmung, β -Blockade oder Kombination beider der CK-Isoenzym-Shift verhindern bzw. minimieren lässt [73, 115], sind sowohl direkte Wirkungen des adrenergen als auch des Renin-Angiotensin-Systems denkbar. Basierend auf den vorstehend diskutierten Ergebnisse, gehen wir davon aus, dass das von uns genutzte Tiermodell sich 6 und 9 Wochen nach MI im Zustand der linksventrikulären Hypertrophie ohne Dekompensation befand. Die CK-Erniedrigung 9 Wochen nach MI könnte als ein erstes Zeichen für eine beginnende Dekompensation gewertet werden.

6.2.2.2. *Lipidperoxidation und antioxidative Enzyme*

Die in der Akutphase beobachtete Steigerung der myokardialen GSH-Px-Aktivität blieb im linken Ventrikel über den gesamten Versuchszeitraum bestehen, so dass 3, 6 und 9 Wochen nach MI im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höhere Aktivitäten beobachtet wurden. Für den rechten Ventrikel war dies nicht der Fall. Die im Zeitraum von 3-9 Wochen nach MI gesteigerte GSH-Px gehört damit neben der Hypertrophie und dem CK-Remodeling zu den Kompensationsmechanismen des Myokards in der chronischen Phase nach MI. Die 14-16 h nach MI gesteigerte myokardiale SOD-Aktivität wurde 3 und 6 Wochen nach Infarkt nicht mehr beobachtet. 9 Wochen nach MI stellte sich die Gesamt-SOD isoliert im linken Ventrikel der MI-Tiere als signifikant erniedrigt - verglichen mit den Kontrollen - dar. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einer gleichartige angelegten Studie von Hill und Singal [118] im lin-

ken Ventrikel nachgewiesen werden. Die erhöhte GSH-Px-Aktivität könnte die Ursache für die Verhinderung von Lipidperoxidation im linken Ventrikel sein.

Die inverse Beziehung zwischen GSH-Px-Aktivität und Lipidperoxidation wird auch durch den Altersgang von GSH-Px und TBARS-Bildung im Myokard der scheinoperierten Tiere dokumentiert. Die Aktivitäten der GSH-Px stiegen in beiden Ventrikeln dieser Gruppe zur 6. Woche hin an und blieben danach in etwa auf diesem Niveau. Zeitgleich nahm die myokardiale Lipidperoxidation bei den scheinoperierten Tieren ebenfalls nur bis zur 6. Woche ab und blieb bis zur 9. Woche auf diesem Level.

Da auch 9 Wochen nach MI der Protektionseffekt gegenüber der Lipidperoxidation trotz der niedrigen SOD-Aktivität erhalten blieb, gehen wir davon aus, dass die GSH-Px-Erhöhung - wie bereits in der Studie mit TGR diskutiert - entscheidend für diese Schutzwirkung ist, die SOD hingegen nur untergeordneten Einfluss hat. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass entgegen den Befunden an den scheinoperierten Tieren bei den MI-Tieren kein signifikanter Altersgang mit letztlich abnehmender TBARS-Konzentration nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist dies ein Anhaltspunkt dafür, dass es in der chronischen Postinfarktphase letztlich doch zu einer, wenn auch sehr moderaten, Steigerung der Lipidperoxidation kommt.

Im Kontrast zu den GSH-Px-Daten unserer Studie stehen Untersuchungen die 8 bzw. 16 Wochen nach MI einen Verlust an GSH-Px beschrieben haben [118]. Allerdings lag in diesen Modellen nachgewiesenermaßen zu den Untersuchungszeitpunkten bereits eine manifeste Herzinsuffizienz vor, die nach Dhalla et al. [76] durch Verlust der antioxidativen Kapazität gekennzeichnet ist. Es überrascht deshalb auch nicht, dass in dieser Studie neben der niedrigen GSH-Px-Aktivität ein Anstieg der Lipidperoxidation beschrieben wurde. Damit wird der zunächst gravierende Ergebnis-Kontrast zu unserem Befund erklärbar, da sich in unseren Experimenten das Herz im Stadium der kompensierten Hypertrophie befand, und kein anerkannter Marker der Insuffizienz - zumindest bis zur 6. Woche nach MI - spezifisch verändert war. Mehrfach ist auch gezeigt worden, dass ein SOD-Verlust eintritt obwohl die GSH-Px noch kompensatorisch gesteigert ist [40, 119]. Dies wird mit einer größeren Empfindlichkeit der SOD gegenüber Inhibition erklärt. Es ist zu vermuten, dass der von uns erstmals in der 9. Woche beobachtete SOD-Abfall eben dieser Dynamik folgt. Möglicherweise ist ein SOD-Verlust ein sehr frühes Zeichen für den beginnenden Übergang der kompensierten in die dekompenzierte Phase der Herzinsuffizienz. Neben unserer Untersuchung liefert die Literatur weitere Belege für die Hypothese, dass ein signifikanter Abfall der GSH-Px mit einer Anstieg der Lipidperoxidation einhergeht, wohingegen hohe GSH-Px Aktivitäten - wie auch im vorlie-

genden Fall - mit niedrigerer Lipidperoxidation und damit auch geringeren Sauerstoffradikal-induzierten Membranschädigungen vergesellschaftet ist [41, 96, 118, 120]. Das unterstreicht die entscheidende Rolle der GSH-Px als ein wichtiger, wenn nicht sogar als wichtigster enzymatischer antioxidativer Faktor zu Verhinderung des Übergangs der Hypertrophie zur de-kompensierten Herzinsuffizienz. Zu diesem Schluss, dass die GSH-Px-Zunahme als bedeutender für die Herzprotektion angesehen wird als der Beitrag der SOD kamen auch Gupta und Singal [40] bei ihren Untersuchungen zum Übergang von kardialer Hypertrophie zur dekom-pensierten Herzinsuffizienz. Wie wir anhand der Hypertonie-induzierten Herzhypertrophie bei TGR zeigten, führen allerdings erhöhte GSH-Px-Level im Myokard nicht automatisch zur vollständigen Inhibition der Lipidperoxidation (dort wurde trotz hoher GSH-Px-Aktivität ge-steigerte Lipidperoxidation im Myokard beobachtet).

Die von uns vorgelegte Studie unterstützt die Hypothese von Singal und Kirshenbaum [50], nach der die Herzinsuffizienzentwicklung erstens durch eine biphasische Modulation enzymatischer Antioxidantien gekennzeichnet ist (Aktivitätssteigerung gefolgt von Aktivitätsverlust) und zweitens der Übergang von der Hypertrophie zur Insuffizienz mit dem Zeitpunkt korreliert, zu dem nach Ausschöpfung der antioxidativen Reserve der antioxidative Schutz des Myokards nicht mehr ausreicht Lipidperoxidation zu verhindern und dadurch eine Myokard-schädigung durch vermehrte Membranschädigungen möglich wird.

6.2.2.3. *Hitzeschockproteine*

Wie auch bei den anderen Parameter beschrieben, wurden bei den Hsp72- und Hsp25-Konzentrationen im nichthypertrophierten rechten Ventrikel keine Unterschiede zwischen scheinoperierten Tieren und Tieren mit MI beobachtet. Entsprechend den Untersuchungen von Delcayre et al. [44] wird Hsp72 nur in Phasen der akuten Stressadaptation vermehrt exprimiert und ist bei stabiler kardialer Funktion häufig nicht nachweisbar. In Übereinstimmung damit sank im nichtinfarzierten Anteil des linken Ventrikels die akut gesteigerte Hsp72-Konzentration bis zur 3. Woche auf das Niveau der scheinoperierten Tiere. Für die im Papillarmuskel in der Akutphase erheblich stärker als im linken Ventrikel gesteigerte Hsp72-Konzentration haben wir ebenfalls im Anschluss an die Akutphase einen Abfall beobachtet. Allerdings lag der Hsp72-Gehalt bei den MI-Tieren auch 3 Wochen und 6 Wochen nach MI noch signifikant über dem der Kontrollen. Erst nach 9 Wochen unterschieden sich MI-Tiere und Kontrollen nicht mehr. Diese im Papillarmuskel auch nach 3 und 6 Wochen noch signifi-kant erhöhten Werte würden demnach auf das Fortbestehen der Stresssituation im Papillar-

muskel jenseits der akuten MI-Phase hinweisen. Entsprechend der wahrscheinlich ischämischen Ursprungsregion der Papillarmuskeln im linken Ventrikel [104] könnte- wie bereits in der Diskussion der Veränderungen in der Akutphase angeführt - eine Minderperfusion des Papillarmuskels auch nach der Akutphase die Ursache für das Fortbestehen der Stresssituation sein und damit die erhöhten Hsp72-Konzentrationen erklären.

Eine Verminderung der Hsp72-Konzentration nach einer MI-induzierten Expressionssteigerung mit dem Erreichen des Bereiches der Kontrollwerte etwa 2 bis 3 Wochen nach MI wurde auch von Kilgore et al. [105] beschrieben. Allerdings erfolgte in dieser Untersuchung die MI-induzierte Hsp72-Erhöhung erst nach 5-7 Tagen im nichtinfarzierten septalen Myokard. Tannonaka et al. [121] fand ebenfalls gesteigerte Hsp72-Konzentration 1 Woche nach MI mit nachfolgendem Abfall bis zur 2. Woche. In dieser Studie ist allerdings die akute Phase nach MI (1. Tag) nicht untersucht worden. In unseren Untersuchungen beobachteten wir im linken Ventrikel 3 Wochen nach MI einen erneuten Anstieg der Hsp72-Konzentration, so dass sie 6 Wochen nach MI wieder signifikant gegenüber den Kontrollen gesteigert war. Bis zur 9. Woche blieb der Mittelwert der Hsp72-Konzentration im linken Ventrikel der MI-Tiere weiterhin über dem der scheinoperierten Kontrollen. Es ist wahrscheinlich, dass hinsichtlich des Hsp72 zwischen akut und chronisch gesteigerter Expression unterschieden werden muß. Während in einer akuten Stresssituation Hsp72 zur Selbstprotektion des Myokard beiträgt, sollte dagegen bei einer Hsp72-Zunahme in der chronischen Phase nach MI - wie in unserem Modell beobachtet - in Betracht gezogen werden, dass langanhaltend gesteigerte Hsp72-Expression, abgeleitet aus der Funktion als Target im Rahmen autoimmunologischer Reaktionen [122], möglicherweise als Promotor in der Herzinsuffizienzgenese fungieren könnte. Die Basis für den erneuten Anstieg von Hsp72 im linken Ventrikel der MI-Tiere könnte der ab der 3. Woche zunehmende CK-Isoenzym-Shift zu den fetalen B-Isoenzymen (CK-MB, -BB) als Zeichen chronisch-ischämischen Stoffwechselbedingungen im Myokard zusammen mit der wachsenden Hypertrophie darstellen.

Das Hsp25 zeigte verglichen mit dem Hsp72 ein nahezu identisches Verhalten. Auch dessen Konzentration vermindert sich von der akuten MI-Phase (14-16 h) zum Zeitpunkt 3 Wochen nach MI sowohl im linken Ventrikel als auch im rechten Ventrikel. Im Gegensatz zum Hsp72 sinkt der Hsp25-Gehalt 3 Wochen nach MI sowohl im linken Ventrikel als auch im Papillarmuskel auf das Niveau der Kontrollen. Auch für das Hsp25 beobachtete wir von der 3. zur 6. Woche einen erneuten Anstieg. Im Gegensatz zum Hsp72 betraf dieser jedoch ausschließlich den Papillarmuskel. Möglicherweise ist zur Hsp25-Expression verglichen mit Hsp72 ein stärkerer Stimulus notwendig, der unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur im Papillar-

muskel erreicht wird. Dies würde dann erklären, warum Hsp25 bis zur 3. Woche auf das Niveau der Kontrollen sinkt, Hsp72 sich ebenfalls vermindert, jedoch zum gleichen Zeitpunkt immer noch über dem Niveau der Kontrollen liegt. 9 Wochen nach MI waren MI-Tiere und Kontrollen hinsichtlich der Hsp25-Konzentration angeglichen. Diese nach 9 Wochen den Kontrollen angegliche Hsp25-Konzentration in unserer Studie, haben Tanonaka et al. [121] in ihrem MI-Modell nicht beobachtet. Hier war die myokardiale Hsp25-Konzentration 8 Wochen nach MI noch signifikant erhöht.

6.2.2.4. Kontraktile Funktion

Auch in diesem Tiermodell wurden Untersuchungen zur kontraktile Funktion der Papillarmuskeln unter Hypoxie/Reoxygenierung durchgeführt, um den Einfluss der beobachteten biochemischen Veränderungen auf die funktionelle Herzleistung zu überprüfen. Insgesamt wirken sich die beschriebenen Veränderungen im hypertrophen Myokard protektiv auf die kontraktile Funktion nach MI aus. Dabei profitieren die Papillarmuskeln hauptsächlich in der Reoxygenierungsphase und dabei insbesondere hinsichtlich ihrer Relaxationsgeschwindigkeit.

Unter Hypoxie kam es in der chronischen Phase nach MI zu allen Untersuchungszeitpunkten (3, 6, 9 Wochen) zu einem vergleichbaren Abfall der PF bei MI-Tieren und Kontrollen. Der Grund dafür ist der schon oben erläuterte Abfall der Ca^{2+} -Sensibilität der Myofilamente aufgrund des raschen Abbaus energiereicher Phosphate zu anorganischem Phosphat [93]. 3 Wochen nach MI unterschieden sich MI-Tiere und Kontrolle auch in der Reoxygenierungsphase hinsichtlich der Kontraktilität nicht. Im Zeitfenster 3. bis 9. Woche beobachteten wir jedoch in den MI-Tiere eine zunehmende Verbesserung der Relaxationsgeschwindigkeit verglichen mit den Kontrollen. Dies wurde am Parameter $(\text{dF}/\text{dt}_{\min})/\text{PF}$ sichtbar.

Daraus lässt sich ableiten, dass die kontraktile Funktion des Myokards 6 und 9 Wochen nach MI weniger empfindlich ist gegenüber Hypoxie/Reoxygenierung als die der scheinooperierten Kontrollen und auch als die der Tiere 3 Wochen nach MI. Dieser protektive Effekt zeigte sich 9 Wochen nach MI ausgeprägter als 6 Wochen nach MI und war zu diesem Zeitpunkt mit der höchsten GSH-Px-Aktivität vergesellschaftet, während die Hsp-Konzentrationen nicht gesteigert waren. Daher kann als Hauptprotektionsfaktor der kontraktile Funktion des Myokards in der chronischen Phase nach MI die GSH-Px verantwortlich gemacht werden. Da der protektive Effekt 9 Wochen nach MI trotz der verminderten SOD-Aktivität am stärksten war, ist dies ein erneuter Hinweis auf die bereits mehrfach betonte untergeordnete Bedeutung der SOD für die Myokardprotektion nach MI.

6.3. *Schlussfolgerungen*

Unsere Untersuchungen zeigen, dass es in der akuten Phase nach MI zu einer parallelen Aktivierung des enzymatischen antioxidativen Systems und des Hsp-Systems im Myokard kommt. Damit können, wie in Kapitel 3 Problemstellung in Hypothese 1 formuliert, beide Systeme bei einer akuten Steigerung von oxidativem Stress im Herz zur Selbstprotektion des Myokards beitragen. Ob auch in der Akutphase, wie nachfolgend für die chronische Phase nach MI ausgewiesen, die GSH-Px das entscheidende myokardiale Protektionssystem ist, können wir gegenwärtig nicht entscheiden.

Dagegen scheint bei chronisch gesteigertem oxidativen Stress (chronische Phase nach MI, chronische Hypertonie) die Myokardprotektion hinsichtlich Hypoxie/Reoxygenierungsstress hauptsächliche Folge der kompensatorischen Steigerung der GSH-Px-Aktivität zu sein. Chronisch gesteigerte Expression von Stressproteinen sollte eher auf der Basis autoimmunologischer Reaktionen im Herz betrachtet werden. Während damit das enzymatische antioxidative System sowohl bei akut als auch bei chronisch gesteigertem oxidativen Stress als Protektionssystem wirksam wird, scheint die Schutzfunktion der Hitzeschockproteine auf Stoffwechselsituationen die durch akut gesteigerten oxidativen Stress gekennzeichnet sind, begrenzt zu sein (Hypothese 2). Unsere Untersuchungen zeigen darüber hinaus im Vergleich zur SOD die herausgehobene Bedeutung der GSH-Px in der Myokardprotektion sowohl bei akut als auch chronisch gesteigertem oxidativen Stress im Herz.

6.4. *Therapeutische Konsequenzen*

Remodeling stellt einen Umbauprozess des Myokards als Reaktion auf verschiedene Reize dar. Das Remodeling im Verlauf der Herzinsuffizienzgenese ist ein von den auslösenden Faktoren relativ unabhängiger, uniformer Prozess, dessen hervorstechendstes, makroskopisches Zeichen die Hypertrophie ist. Zum Remodeling gehören neben der Modulation des CK-Isoenzymmusters unserer Ansicht nach auch Aktivitätsänderungen bzw. Konzentrationsänderungen von myokardialen Schutzsystemen gegen Schädigungsreaktionen die durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Myokardiales Remodeling stellt einen zeitlich begrenzten Kompensationsmechanismus im Verlauf der Herzinsuffizienzgenese dar. Eine Schlüsselrolle bei der Induktion des Remodelings könnten Sauerstoffradikale haben. Die im Verlauf des Remodelings auftretenden biochemischen Veränderungen im CK-, Hsp- und Antioxidationsystem führen dabei in unterschiedlicher Ausprägung und zeitlicher Abfolge zu einer Protektion des

Myokards gegenüber hypoxisch/ischämischen Ereignissen. Die zielgerichtete Modulation dieser Systeme - mit dem Ziel einer therapeutischen Nutzung bei Herzerkrankungen - wäre wünschenswert, stellt aber in der Praxis ein bisher ungelöstes Problem dar.

Ob erste Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass ACE-Hemmung und β -Blockade ihre protektiven Effekte nach MI möglicherweise auch über eine die Steigerung der myokardialen GSH-Px und SOD-Aktivität realisieren [96], einen entsprechenden Weg weisen, muß abgewartet werden. Für die Möglichkeit einer pharmakologische Induktion enzymatischer Antioxidantien sprechen auch Versuche, in denen es gelang mit Probucol, einem Lipidsenker, GSH-Px und SOD im Myokard zu induzieren, was einen vorteilhaften Einfluss auf die Adriamycin-induzierte Kardiomyopathie hatte [123]. Auch Quercetin, ein Bioflavonoid, ist in der Lage die Katalase- und GSH-Px-Aktivitäten im Ratten-Myokard bei Streptozotocin-induzierter, diabetischer Kardiomyopathie zu erhöhen [124]. Eine andere Möglichkeit der therapeutischen Beeinflussung des myokardialen antioxidativen Systems sollte sich durch die Supplementation mit nichtenzymatischen Antioxidantien und Spurenelementen ergeben. So ist die verstärkte Expression von GSH-Px immer an die ausreichende Verfügbarkeit von Selen gebunden. Bekannt sind auch die enge Wechselwirkungen von GSH-Px, Vitamin E und Vitamin C bei der Metabolisierung von Lipidperoxiden (Kapitel 2.2.2.2). Im Tierversuch konnte durch Zugabe von Antioxidantien in den kardiopulmonalen Bypass bei herzchirurgischen Eingriffen eine bessere postoperative, funktionelle Erholung mit verminderte Lipidperoxidation erreicht werden [125].

Trotz zahlreicher Studien, die den präventiven und therapeutischen Effekt von Vitamin E belegen, hält sich der klinische Einsatz in Grenzen. Der positive Einfluss von Vitamin E auf die Entstehung und Folgen der Koronaren Herzkrankheit kann als am besten gesichert gelten. Die umfassendsten Ergebnisse zum protektiven Effekt der pharmakologischen Vitamin E-Therapie beim Menschen wurden 1996 im Rahmen der CHAOS-Studie (Cambridge Heart Antioxidant Study) gesammelt. Dabei konnte die tägliche Gabe von Vitamin E bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Koronarsklerose die Rate der nicht-tödlichen Myokardinfarkte signifikant reduzieren [126]. Tierexperimentell ließ sich sogar die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques gänzlich verhindern [127]. Dies impliziert so auch einen präventiven Effekt. Deshalb ist auch bei Hypertonie, die als Risikofaktor bei der KHK-Entstehung eine wichtige Rolle spielt, durch therapeutische α -Tocopherol-Substitution ein präventiver Effekt zu erwarten, zumal, wie in dieser Arbeit zum Myokardremodeling bei chronischer Hypertonie im Rattenmodell, auch bei der essentiellen Hypertonie des Menschen reduzierte Serum-

Vitamin E-Level gemessen wurden [80]. Selbst nach bereits eingetretenem Myokardinfarkt konnte die Mortalität und die Infarktgröße durch frühzeitige Vitamin E-Supplementation im Tierexperiment gemindert werden [128]. Es bleibt zu hoffen, dass der pharmakologische Einsatz von α -Tocopherol in Zukunft eine größere klinische Akzeptanz findet. Möglicherweise kann Selbstprotektion des Myokards durch Expression von antioxidativen Enzymen und Hsp durch zusätzliche Gabe nichtenzymatischer Antioxidantien zeitlich ausgeweitet und so der Übergang zur dekompensierten Herzinsuffizienz verzögert werden

Wie in dieser Arbeit gezeigt, spielen auch die Hitzeschockproteine eine wesentliche Rolle bei der Myokardprotektion. Seit diese Erkenntnisse vorliegen, wurde versucht präventive und therapeutische Einsatzmöglichkeiten am Menschen zu finden. So kann beispielsweise der prä- und postoperative Hsp-Gehalt prognostische Bedeutung für die Wiederherstellung der Funktion, das Langzeitüberleben bzw. die Transplantatabstoßung in der Herzchirurgie erlangen [129]. Da eine in-vivo Hitzestress-Exposition des Menschen zur myokardialen Präkonditionierung gegenüber ischämischen Ereignissen nicht durchführbar ist, müssen andere Wege zur Hsp-Induktion gefunden werden. So könnte beispielsweise in der Transplantationsmedizin eine kurzfristige präoperative Temperaturerhöhung des Transplantats zur besseren Hsp-vermittelten, postoperativen, funktionellen Leistung bei verminderten Nekrosen führen. Dies wurde bereits erfolgreich an Ratten demonstriert [130]. Andere Möglichkeiten könnten sich zukünftig durch die pharmakologische Induktion von Hitzeschockproteinen eröffnen. Hier sind jedoch bisher kaum Ansätze zu sehen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das geschädigte Myokard nach MI sowohl in der akuten Phase als auch im Rahmen der chronischen Schädigung Mechanismen zur Selbstprotektion gegenüber Sauerstoffradikal-induzierter Schädigung aktivieren kann. Durch therapeutische Einflussnahme kann, wie für die chronische Phase nach MI gezeigt [96], die Selbstprotektion des Myokards zeitlich ausgeweitet werden und so der Übergang zur dekompensierten Herzinsuffizienz verzögert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich unter anderem auf folgende Bereiche der ischämischen Herzerkrankung und des Myokardinfarkts anwenden:

- *Prävention:* Würde es gelingen, beispielsweise bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine Induktion von Hitzeschockproteinen und antioxidativen Enzymen im Myokard zu bewirken, könnte so im Falle eines Myokardinfarktes eine geringere Ausdehnung resultieren und die Reperfusionstherapie könnte mit noch größeren Erfolgsaussichten angewandt werden. Bereits heute wird vermutet das mehrfache passagere Ischämien (Angina pectoris) zur Selbstprotektion des Myokards führen. Auch in der Transplantationsmedizin könnte durch präoperative Hsp- und GSH-Px-Induktion eine postoperative bessere Wiederherstellung der kontraktilen Myokardfunktion erreicht werden. Zur Prävention des MI hält auch die Vitamin E-Substitution therapeutische Möglichkeiten offen.
- *Therapie:* Auch der Einsatz der Vitamin E-Substitution und damit möglicherweise Unterstützung der Selbstprotektion des Myokards bei bereits eingetretenem MI könnte die Infarktgröße reduzieren. Durch ACE-Hemmung und β -Blockade lässt sich entweder direkt oder indirekt bereits heute Einfluss auf die myokardiale enzymatische antioxidative Kapazität nach MI nehmen.
- *Rezidivprophylaxe:* Eine Induktion endogener antioxidativer Enzyme, und dabei in erster Linie der GSH-Px, könnte über eine verbesserte Ischämieresistenz die Prognose bei Reinfarkten verbessern und so die Mortalität des akuten MI erheblich senken.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Gesteigerter oxidativer Stress ist ein typisches Zeichen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Es wird postuliert, dass der Übergang von der Herzhypertrophie ohne Insuffizienz-spezifische Funktionseinschränkung zur dekompenzierten Herzinsuffizienz durch ein Missverhältnis zwischen oxidativem Stress im Myokard und der Aktivität bzw. Konzentration endogener Schutzsysteme gekennzeichnet ist. Zu diesen Schutzsystemen gehören das enzymatische antioxidative System und das System der Hitzeschockproteine (Hsp). Eine kompensatorische Aktivitäts- bzw. Konzentrationssteigerung beider Systeme wird als wesentlich für die Myokardprotektion angesehen. Denkbar ist, dass beide Systeme parallel zur Selbstprotektion des Myokards im Verlauf der Herzinsuffizienzgenese beitragen. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass das enzymatische antioxidative System und das Hsp-System zeitlich differenziert als Protektionssysteme bei Herzinsuffizienz auftreten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist das Auffinden von Herzinsuffizienz-typischen Veränderungen im enzymatischen antioxidativen System und im Hsp-System und ihre Zuordnung zu verschiedenen Stadien der Herzinsuffizienzentwicklung. Dazu untersuchten wir in zwei Rattenmodellen: 1. der Hypertonie- und 2. der Myokardinfarkt-induzierten Herzinsuffizienz, zum einen die Charakterisierung des Hypertrophiegrades und die Veränderungen im myokardialen Creatinkinase-System (CK). Zum anderen eruierten wir im Herzgewebe als Repräsentanten für das enzymatische antioxidative System die Glutathionperoxidase (GSH-Px) und Superoxiddismutase (SOD) und als Vertreter des Hsp-Systems das Hsp25 und Hsp72. Die auftretenden Änderungen in diesen Systemen prüften wir hinsichtlich ihres Einflusses auf die Hypoxie/Reoxygenierungsempfindlichkeit des Herzens.

In der ersten Teilstudie untersuchten wir doppelt transgene Ratten für humanes Renin und Angiotensinogen (TGR). Deren permanente Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) führte zur Myokardhypertrophie, von der jedoch nur der linke Ventrikel betroffen war. Isoliert im linken Ventrikel wurde gleichzeitig ein Verlust an CK-Aktivität, verbunden mit einem Isoenzym-Shift zu höheren Anteilen an CK-MB und CK-BB beobachtet. Hinsichtlich der Stressproteine kam es isoliert im linken Ventrikel zur Hsp25-Zunahme. Das Hsp72 war unverändert. Im Gegensatz dazu waren beide Ventrikel von gesteigertem oxidativen Stress betroffen. Dies wird direkt durch die Zunahme der Lipidperoxidation in beiden Ventrikeln und der Erniedrigung der Serum-Vitamin E-Konzentration sowie indirekt durch die kompensatorische Zunahme der GSH-Px-Aktivität in beiden Ventrikeln und im Papillarmuskel angezeigt. Hinsichtlich der SOD wurden in diesem Modell der Herzinsuffizienzgenese keine Ver-

änderungen beobachtet.

Die Zunahme der GSH-Px-Aktivität und des Hsp25-Gehalts erhöhte in den transgenen Tieren die Toleranz gegenüber Hypoxie/Reoxygenierungsstress. Anhand der Ergebnisse für den linken Ventrikel, kann auf eine Assoziation von Hypertrophie, CK-Isoenzym-Shift und Hsp25-Expression geschlossen werden. Möglicherweise ist die, der Aktivierung des RAS folgende Hypertrophie das Bindeglied zum CK-Isoenzym-Shift und zur gesteigerten Hsp25-Expression. Es wird postuliert, dass die RAS-Aktivierung über die Steigerung von oxidativem Stress zur Hypertrophieentwicklung beiträgt. Die aus dem CK-Isoenzym-Shift zu vermutende, partiell hypoxische Stoffwechsellage als Konsequenz der Hypertrophie im linken Ventrikel könnte gemeinsam mit dem gesteigerten oxidativen Stress infolge der RAS-Aktivierung die Induktion von Hsp25 verursachen. Da die GSH-Px auch im rechten, nichthypertrophierten Ventrikel nach RAS-Aktivierung ansteigt, scheint dieser Effekt keine primär Hypertrophie-assoziierte Reaktion des Myokards zu sein. Denkbar ist, dass die GSH-Px hochsensitiv auf den durch die RAS-Aktivierung initiierten oxidativen Stress reagiert, der sich in beiden Ventrikeln als gesteigerte Lipidperoxidation feststellen lässt und nicht die zusätzlich im linken Ventrikel vorherrschende, partiell hypoxische Stoffwechsellage benötigt. Die unveränderte SOD-Aktivität ist trotz des gesteigerten oxidativen Stresses im Myokard nicht zwangsläufig als Nichtbeteiligung dieses Enzyms an den Remodelingvorgängen im Herz bei RAS-Aktivierung zu werten. Aufgrund von Literaturdaten ist es denkbar, dass die Phase der kompensatorische Aktivitätszunahme für die SOD zu dem von uns gewählten Untersuchungszeitpunkt bereits überschritten ist. Der nach dieser Phase folgende SOD-Verlust würde die im Vergleich zu den Kontrollen unveränderte Aktivität erklären und einen weiteren Hinweis auf die bereits mehrfach postulierte eingeschränkte Bedeutung der SOD als myokardialer Schutzfaktor bei chronisch gesteigertem oxidativen Stress liefern.

In der zweiten Teilstudie wurde im Rattenmodell ein Myokardinfarkt (MI) induziert. Unterschieden wurden die Untersuchungszeitpunkte 14-16 Stunden als Myokardinfarktphase sowie 3, 6 und 9 Wochen als chronische Phase nach MI. Hypertrophie und CK-Isoenzym-Shift mit vermehrter Expression von CK-MB und -BB wurden in der akuten Phase nicht beobachtet. Beide Prozesse zur Kompensation der Herzfunktion sind erst nach Wochen (3 bzw. 6 Wochen) sichtbar. In beiden Ventrikeln und im Papillarmuskel waren aber die GSH-Px- und SOD-Aktivität in der akuten Phase nach MI gesteigert. Dies weist erneut auf die Unabhängigkeit der kompensatorischen Aktivitätssteigerung der antioxidativen Enzyme von der Hypertrophieentwicklung hin. Hsp72 und Hsp25 waren während der Akutphase nach MI im Papillarmuskel und im linken, nicht jedoch im rechten Ventrikel erhöht. Dieser Unterschied zwi-

schen den antioxidativen Enzymen und den Hsp kann mit dem Vorliegen ischämischer Stoffwechselbedingungen (nach Literaturdaten in unserem Modell nur im Papillarmuskel und in geringerem Umfang im linken, nicht aber im rechten Ventrikel) für die Hsp-Expression, nicht jedoch für die Aktivitätssteigerung von GSH-Px und SOD erklärt werden. Folge der in der akuten Phase nach MI gesteigerten Protektionssysteme im Myokard sind eine verbesserte kontraktile Funktion bei experimentellem Hypoxie/Reoxygenierungsstress. Damit haben wir erstmals eine Selbstprotektion des Myokards während eines akuten MI nachgewiesen.

Während sich die SOD und die Hitzeschockproteine nach der akuten Phase dem Niveau der scheinoperierten Kontrollen annäherten, blieb die hohe GSH-Px-Aktivität - allerdings nur im linken Ventrikel - über den gesamten Untersuchungszeitraum (3-9 Wochen) bestehen. Dies war von einem CK-Isoenzym-Shift zu fetalen B-Isoenzymen ab der 3. Woche und dem Auftreten kardialer Hypertrophie ab der 6. Woche begleitet. Beide Veränderungen wurden ebenfalls nur im linken Ventrikel mit - gegenüber anderen Studien - vergleichsweise geringer Ausprägung beobachtet. Ein gesteigerter Lungengewicht/Körpergewicht-Quotient als Zeichen des Überganges in die dekompensierten Herzinsuffizienz wurden auch nach 9 Wochen nicht beobachtet. Der nach 9 Wochen im linken Ventrikel nachgewiesene SOD-Verlust könnte zusammen mit der CK-Verminderung allerdings ein erstes Zeichen für beginnende Dekompensation sein.

Die gesteigerte GSH-Px-Aktivität in der chronischen Phase nach MI war mit einer zunehmender Toleranz des Herzens gegenüber Hypoxie/Reoxygenierungsstress vergesellschaftet. Die Protektion betraf dabei in erster Linie das Relaxationsverhalten in der Reoxygenierungsphase. Da diese Protektion auch in der 9. Woche nach MI trotz der zu diesem Zeitpunkt bereits linksventrikulär verminderten SOD-Aktivität sichtbar war, kann als ein weiterer Hinweis für die untergeordnete Rolle der SOD im Vergleich zur GSH-Px bei der Myokardprotektion gegenüber oxidativem Stress angesehen werden.

In der akuten Phase nach MI können - basierend auf den vorgelegten Ergebnissen - antioxidative Enzyme und Hitzeschockproteine gemeinsam zur Toleranz des Herzens bei Hypoxie/Reoxygenierung beitragen. Ob, wie nachfolgend für die chronische Phase nach MI ausgewiesen, die GSH-Px auch das entscheidende myokardiale Protektionssystem in der akuten Phase ist, kann anhand der von uns erbrachten Ergebnisse nicht entschieden werden.

Eine parallele Aktivierung beider Systeme zur Myokardprotektion zeigte sich auch im Tiermodell der chronischen RAS-Aktivierung (TGR). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Modell das Hsp25 weniger zur Protektion sondern vielmehr im Rahmen auto-

immunologischer Prozesse exprimiert wird und damit eher eine Progredienz in der Herzinsuffizienzgenese dokumentiert. Dagegen ist in der chronischen Phase nach MI die Myokardprotektion hauptsächlich als Folge der kompensatorischen Steigerung der GSH-Px-Aktivität bei keiner bzw. gering gesteigerte Hsp-Expression anzusehen. Die Protektion des Myokards 9 Wochen nach MI als Resultat der alleinigen GSH-Px-Zunahme weist hier auf die herausgehobene Bedeutung dieses Enzyms für die Herzprotektion bei oxidativem Stress hin.

Die vorgelegten tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass das Herz sowohl unter akut als auch unter chronisch gesteigertem oxidativen Stress Mechanismen zur Selbstprotektion aktivieren kann, die eine Prävention bzw. Minimierung von Schädigungsreaktionen durch Sauerstoffradikale ermöglichen. Die Beteiligung solcher Schädigungsreaktionen an der Pathogenese der Herzinsuffizienz, sollte Anlass geben, über Konzepte nachzudenken, die eine optimale Ausschöpfung der auf den oxidativen Stress gerichteten myokardialen Selbstprotektion ermöglichen, um über diesen Weg protektiv in die Initiation und Progredienz der Herzinsuffizienz einzugreifen.

8. LITERATUR

- [1] Statistisches Bundesamt (Herausg.). Gesundheitsbericht für Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Metzler-Poeschel-Verlag, Stuttgart; 1998: 162-164, 462
- [2] Lohr M. Innere Medizin: Kompendium für Studium und Klinik. 1.Auflage, Ullstein-Medical-Verlag, Wiesbaden; 1998: 2
- [3] Ganten D, Ruckpaul K. Herz-Kreislauf-Erkrankungen. 1. Auflage, Springer-Verlag; 1998: 147-200
- [4] Schäfer JR. Präventive Kardiologie: Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit. 1.Auflage, Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York; 1998: 58-59
- [5] Braunwald E, für die deutsche Ausgabe: Schmailzi KJG. Zellular- und Molekularbiologie kardiovaskulärer Erkrankungen. in: Harrisons Innere Medizin. 13.Auflage (Deutsche Ausgabe), Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH Berlin; 1995: 1124-1130
- [6] Packer, M. Survival in patients with chronic heart failure and its potential modification by drug therapy. In: Cohn JN (Herausg.). Drug Treatment of Heart Failure, 2nd ed. ATC International; 1988: 273
- [7] Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79: 215-62
- [8] Eichhorn EJ, Bristow MR. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. *Circulation.* 1996; 94: 2285-2296
- [9] Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol.* 1997; 80: 15L-25L
- [10] Blaufarb IS, Sonnenblick EH. The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling. *Am J Cardiol.* 1996; 77: 8C-16C
- [11] Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation.* 1998; 98: 794-799

-
- [12] Kingma JG Jr. Cardiac adaptation to ischemia-reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 874: 83-99
- [13] Pauletto P, Piccolo D, Scannapieco G, et al. Left ventricular hypertrophy in hypertension. Changes in isomyosins and creatine-kinase isoenzymes. *Am J Med.* 1988; 84: 122-124
- [14] Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, et al. Creatine kinase system in failing and non-failing human myocardium. *Circulation.* 1996; 94: 1894-1901
- [15] Ingwall JS, Bradke FR, Pavelec RS, et al. Alterations in creatine phosphokinase activity and isoenzyme composition in the volume loaded, hypertrophied heart. *Circulation.* 1976; 54 (Suppl II): 59
- [16] Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, et al. The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N Engl J Med.* 1985; 313: 1050-1054
- [17] Ingwall JS. The hypertrophied myocardium accumulates the MB-creatine kinase isozyme. *Eur Heart J.* 1984; 5 (Suppl F): 129-139
- [18] Pryor WA. Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol.* 1986; 48: 657-667
- [19] Guarnieri C, Muscari C, Caldarera CM. Oxygen radicals and tissue damage in heart hypertrophy, in: Harris P, Pool-Wilson PA (eds.) *Advances in myocardiology.* Plenum press Publishing Corp. New York, 1985; Vol. 5: 191-199
- [20] Petkau A. Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury. *Br J Cancer.* 1987; 55, (Suppl VIII): 87-95
- [21] McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide. Roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982; 60: 1346-1352
- [22] Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equation through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovas Res.* 1992; 26: 641-655
- [23] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997; 272: 20313-20316

- [24] Schimke I, Haberland A. Sauerstoff-Radikale und Herz-Kreislauf-Krankheiten: Pathogenetische Mechanismen, therapeutische Möglichkeiten. *Z Kardiologie*. 1993; 82: 601-609
- [25] Sies H. Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem*. 1993; 215: 213-219
- [26] Flohe L, Schlegel W. Glutathionperoxidase. IV. Intrazelluläre Verteilung des Glutathionperoxidase-Systems in der Rattenleber. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1971; 352: 1401-1410
- [27] Stryer L. Biochemie. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford; 1994: 454-455
- [28] McCord JM, Fridovich I. Superoxiddismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 224: 6049-6055
- [29] Haberland A, Mäder K, Stößer R, et al. Comparison of malondialdehyde and hydrogen peroxide modified CuZnSOD by EPR spectroscopy. *Agent Actions*. 1993; 40: 166-170
- [30] Olafsdottir K, Reed DJ. Retention of oxidized glutathion by isolated liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 964: 377-382
- [31] Zoeger D, Beyersmann D, Rensig L, et al. Stressverarbeitung in der Zelle. *Naturwiss Rdsch*. 1992; 45: 9-12
- [32] Das DK, Engelmann RM, Kimura Y. Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischemia. *Cardiovasc Res*. 1993; 27: 578-584
- [33] Benjamin JB, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998; 83: 117-132
- [34] Goldhaber JJ, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension*. 1992; 20: 118-127
- [35] Schimke I, Haberland A, Will-Shahab L, et al. In vitro effects of reactive O₂ species on the β -receptor-adenylylcyclase-system. *Mol Cell Biochem*. 1992; 110: 41-46
- [36] Kalra A, Lautner JD, Lorne Massey K, et al. Oxygen free radical induced release of lysosomal enzymes in vitro. *Mol Cell Biochem*. 1988; 84: 233-238

- [37] Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 1988; 240: 640-642.
- [38] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000; 18: 655-673
- [39] Fukuchi T, Kobayashi A, Kaneko M, et al. Possible involvement of free radicals and antioxidants in the early stages of the development of cardiomyopathy in BIO 14.6 syrian hamster. *Jpn Heart J*. 1991; 32: 655-666
- [40] Gupta M, Singal PK. Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy. *Circ Res*. 1989; 64: 398-406
- [41] Wagner KD, Geil D, Schimke I, et al. Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30: 2341-2353
- [42] Kirshenbaum LA, Hill M, Singal KP. Endogenous antioxidants in isolated hypertrophied cardiac myocytes and hypoxia-reoxygenation induces injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1995; 27: 263-274
- [43] Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (Heat Shock) Proteins. Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res*. 1998; 83: 117-132
- [44] Delcayre C, Samuel JL, Marotte F, et al. Synthesis of stress proteins in rat cardiac myocytes 2-4 days after imposition of hemodynamic overload. *J Clin Invest*. 1988; 82: 460-468
- [45] Joyeux M, Lagneux C, Bricca G, et al. Heat stress-induced resistance to myocardial infarction in the isolated heart from transgenic [(mREN-2)27] hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1998; 40: 124-130.
- [46] Leger JP, Smith FM, Currie RW. Confocal microscopic localization of constitutive and heat shock-induced proteins HSP70 and HSP27 in the rat heart. *Circulation*. 2000; 102: 1703-1709
- [47] Lutsch G, Wieske W, Stahl J, et al. Localization of hsp25/27 and α B-Crystallin in heart and kidney tissue by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Eur J Cell Biol*. 1995; 67 (Suppl. 41): 25

- [48] Benndorf R, Hayeß K, Rayazantsew S, et al. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein hsp25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem.* 1994; 269: 20780-20784
- [49] Kaufmann SHE, Schoel B. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* Cold Spring Harbor Laboratory press. 1994: 495
- [50] Singal PK, Kirshenbaum LA. A relative deficit in antioxidant reserve may contribute in cardiac failure. *Can J Cardiol.* 1990; 6: 47-49.
- [51] Das DK, Engelman RM, Kimura Y. Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischemia. *Cardiovasc Res.* 1993; 27: 578-584
- [52] Maulik N, Engelman RM, Wei Z, et al. Interleukin-1 α preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation.* 1993; 88: 387-394
- [53] Xi L, Chelliah J, Nayeem MA, et al. Whole body heat shock fails to protect mouse heart against ischemia/reperfusion injury: role of 72 kDa heat shock protein and antioxidant enzymes. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30: 2213-2227
- [54] Kukreja RC, Kontos MC, Loesser KE, et al. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol.* 1995; 267: H2213-H2219
- [55] Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res.* 1992; 599: 246-252
- [56] Bohlender J, Fukamizu A, Lippoldt A, et al. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension.* 1997; 29: 428-434
- [57] Bohlender J, Ménard J, Wagner J, et al. Human renin-dependent hypertension in rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension.* 1996; 27: 535-540
- [58] Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. A method of coronary artery occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954; 140: 675-682
- [59] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-169

- [60] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *J Anal Biochem.* 1971; 44: 276-287
- [61] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358
- [62] Lutsch G, Vetter R, Offhauss U, et al. Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin in rat and human heart. *Circulation.* 1997; 96: 3466-3476.
- [63] Lowry et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275
- [64] Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993; 73: 413-423
- [65] Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol.* 1990; 259: H610-H618
- [66] Puri PL, Avantaggiati ML, Burgio VL, et al. Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-Jun/c-Fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 22129-22134
- [67] Swynghedauw B, Chevalier B, Medigue C, et al. Molecular basis of the regression of cardiac hypertrophy. *J Card Fail.* 1996; 2(Suppl 4): S21-S27
- [68] Baillard C, Mansier P, Ennezat PV, et al. Converting enzyme inhibition normalizes QT interval in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 36: 350-354
- [69] Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens.* 1989; 11: 1325-1350
- [70] Heymes C, Swynghedauw B, Chevalier B. Activation of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene expression in the left ventricle of senescent rats. *Circulation.* 1994; 90: 1328-1333
- [71] Laser A, Ingwall JS, Tian R, et al. Regional biochemical remodeling in non-infarcted tissue of rat heart post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28: 1531-1538

- [72] Spencer RG, Buttrick PM, Ingwall JS. Function and bioenergetics in isolated perfused trained rat hearts. *Am J Physiol.* 1997; 272:H409-417
- [73] Hgel S, Horn M, Groot MD, et al. Effects of ACE inhibition and β -receptor blockade on energy metabolism in rats postmyocardial infarction. *Am J Physiol.* 1999; 277: H2167-H2175
- [74] Ingwall JS, Atkinson DE, Clarke K, et al. Energetic correlates of cardiac failure: Changes in the creatine kinase system in the failing myocardium. *Eur Heart J.* 1990; 11 (Suppl.B): 108-115
- [75] Sharkey SW, Murakami MM, Smith SA, et al. Canine myocardial creatine kinase isoenzymes after chronic coronary artery occlusion. *Circulation.* 1991; 84: 2211
- [76] Dhalla AK; Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol.* 1994; 266: H1280-H1285
- [77] Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, et al. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem.* 1992; 111: 109-115
- [78] Tokoro T, Ito H, Suzuki T. Alterations in mitochondrial DNA and enzyme activities in hypertrophied myocardium of stroke-prone SHR. *Clin Exp Hypertens.* 1996; 18: 595-606
- [79] Ito H, Torii M, Suzuki T. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 1995; 17: 803-816
- [80] Russo C, Olivieri O, Girelli D, et al. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1998; 16: 1267-1271
- [81] Comini L, Gaia G, Curello S, et al. Right heart failure chronically stimulates heat shock protein 72 in heart and liver but not in other tissues. *Cardiovasc Res.* 1996; 31: 882-890
- [82] Knowlton AA, Kapadia S, Torre-Amione G, et al. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30: 811-818

- [83] Lutsch G, Vetter R, Offhauss U, et al. Abundance and location of the small heat shock proteins Hsp25 and α B-crystallin in rat and human heart. *Circulation*. 1997; 96: 3466-3476
- [84] Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against injury. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 874: 66-68
- [85] Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, et al. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*. 1997; 96: 4343–4348.
- [86] Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, et al. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death. *EMBO J*. 1996; 15: 2695-2706
- [87] Preville X, Salvemini F, Giraud S, et al. Mammalian small heat stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphat dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp Cell Res*. 1999; 247: 61-78
- [88] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86: 494-501
- [89] Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1994; 266: H2568–H2572.
- [90] Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*. 1998; 19 (Suppl B): B2-B11
- [91] Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*. 1995; 96: 2247-2259
- [92] Mantle D, Patel VB, Why HJ, et al. Effects of lisinopril and amlodipine on antioxidant status in experimental hypertension. *Clin Chim Acta*. 2000; 299: 1-10
- [93] Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res*. 1987; 60: 153-168

- [94] Bers DM. Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res Cardiol.* 1997; 92 (Suppl 1): 1-10
- [95] Rowe TC, Manson NH, Caplan M, et al. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leucocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res.* 1983; 53: 584-591
- [96] Theres H, Wagner KD, Schulz S, et al. Oxygen radical system in chronic infarcted rat heart: the effect of combined beta blockade and ACE inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35: 708-715
- [97] Matsui Y, Hashimoto H, Tsukamoto H, et al. Disappearance and appearance of isoenzymes of creatine kinase, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in the myocardium undergoing infarction. *Cardiovasc Res.* 1989; 23: 249-253
- [98] Roth E, Torok B, Zsoldos T, et al. Lipid peroxidation and scavenger mechanism in experimentally induced heart infarcts. *Basic Res Cardiol.* 1985; 80: 530-536
- [99] Herbaczynska-Cedro K, Gordon-Majszak W. Evidence for increased lipid peroxidation in the non-ischaemic portion of the heart with coronary occlusion. *Cardiovasc Res.* 1989; 23: 98-103
- [100] Siwik DA, Tzotzis JD, Pimental DR, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res.* 1999; 85: 147-153
- [101] Assem M, Teyssier JR, Benderitter M, et al. Pattern of superoxide dismutase enzymatic activity and RNA changes in rat heart ventricles after myocardial infarction. *Am J Pathol.* 1997; 151: 549-555
- [102] Marber MS, Walker JM, Latchman DS, et al. Myocardial protection after whole body heat stress in the rabbit is dependent on metabolic substrate and is related to the amount of the inducible 70-kD heat stress protein. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1087-1094
- [103] Marber MS, Mestril R, Chi SH, et al. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1446-1456

- [104] Yu H, Yokoyama M, Asano G. Time course of expression and localization of heat shock protein 72 in the ischemic and reperfused rat heart. *Jpn Circ J.* 1999; 63: 278-287
- [105] Kilgore JL, Musch TI, Ross CR. Regional distribution of Hsp70 proteins after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 1996; 91: 283-288
- [106] Knowlton AA, Eberli FR, Brecher P, et al. A single myocardial stretch or decreased systolic fiber shortening stimulates the expression of heat shock protein 70 in the isolated, erythrocyte-perfused rabbit heart. *J Clin Invest.* 1991; 88: 2018-2025
- [107] Osaki J, Haneda T, Kashiwagi Y, et al. Pressure-induced expression of heat shock protein 70 mRNA in adult rat hearts is coupled both to protein kinase A-dependent and protein kinase C-dependent systems. *J Hypertens.* 1998; 16: 1193-1200
- [108] Andres J, Sharma HS, Knoll R, et al. Expression of heat shock proteins in the normal and stunned porcine myocardium. *Cardiovasc Res.* 1993; 27: 1421-1429
- [109] Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, et al. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation.* 1997; 96 (Suppl II): 216-220
- [110] Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, et al. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect.* 1998; 106 (Suppl 5): 1219-1228
- [111] Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, et al. Targeted disruption of the mouse Sod I gene makes the hearts vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ Res.* 2000; 86: 264-269
- [112] Theres HP, Wagner KD, Romberg D, et al. Combined treatment with ramipril and metoprolol prevents changes in the creatine kinase isoenzyme system and improves hemodynamic function in rat hearts after myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2000; 14: 597-606
- [113] Neubauer S, Frank M, Hu K, et al. Changes of creatine kinase gene expression in rat heart post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30: 803-810
- [114] Neubauer S, Horn M, Naumann A, et al. Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1092-1100

- [115] Laser A, Neubauer S, Tian R, et al. Long-term beta-blocker treatment prevents chronic creatine kinase and lactate dehydrogenase system changes in rat hearts after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 27: 487-493
- [116] Bristow MR, Anderson FL, Port JD, et al. Differences in beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991; 84: 1024-1039
- [117] Ishikawa K, Hashimoto H, Mitani S, et al. Enalapril improves heart failure induced by monocrotaline without reducing pulmonary hypertension in rats: role of preserved myocardial creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes. *Int J Cardiol*. 1995; 47: 225-233
- [118] Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*. 1996; 148: 291-300
- [119] Schimke I, Schikora M, Meyer R, et al. Oxidative stress in the human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation. *Mol Cell Biochem*. 2000; 204: 89-96
- [120] Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant response during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation*. 1997; 96: 2414-2420
- [121] Tanonaka K, Yoshida H, Toga W, et al. Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 283: 520-525
- [122] Kaufmann SHE, Schoel B. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.*: Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY; 1994: 495
- [123] Iliskovic N, Hasinoff BB, Malisza KL, et al. Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 1999; 196: 43-49
- [124] Sanders RA, Rauscher FM, Watkins JB 3rd. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001; 15: 143-149

- [125] Ihnken K, Morita K, Buckberg GD, et al. Prevention of reoxygenation injury in hypoxaemic immature hearts by priming the extracorporeal circuit with antioxidants. *Cardiovasc Surg.* 1997; 5: 608-619
- [126] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996; 347: 781-786
- [127] Ozer NK, Azzi A. Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology.* 2000; 148: 179-185
- [128] Sethi R, Takeda N, Nagano M, et al. Beneficial effects of vitamin E treatment in acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2000; 5: 51-58
- [129] Demidov ON, Tyrenko VV, Svistov AS, et al. Heat shock proteins in cardiosurgery patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 16: 444-449
- [130] Gowda A, Yang C, Asimakis GK, et al. Heat shock improves recovery and provides protection against global ischemia after hypothermic storage. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66: 1991-1997

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Arbeit von mir eigenständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt, und die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur vollständig aufgeführt sind.

Berlin, den 17.08.2001

Karsten Mydlak

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Karsten Mydlak
Geburtsdatum/-ort:	08.07.1975, Cottbus
Anschrift:	Sonntagstr. 10 10245 Berlin
Telefon:	030-2917344
E-Mail:	karsten.mydlak@web.de
Eltern:	Vater: Dr. habil. Gerald Mydlak Mutter: Irene Monika Mydlak, geb. Pohl
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

SCHULBILDUNG

1981-1983	23.Oberschule (POS "Pablo Neruda") Cottbus
1983-1991	21.Oberschule (POS "Friedrich Engels") Cottbus
1991-1993	2.Gymnasium "Fürst Pückler", Cottbus
	Abschluss: Allgemeine Hochschulzugangsberechtigung

ZIVILDIENTST

7/1993-9/1994	im Carl-Thiem-Klinikum Cottbus auf einer traumatologischen Station
---------------	--

HOCHSCHULBILDUNG

10/1994-06/2001	Humboldt-Universität zu Berlin: Studiengang Medizin
09/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)
04/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
06/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: (Note: gut)

FAMULATUREN

08/1997	Orthopädie: Carl-Thiem-Klinikum Cottbus
09/1997	Ophthalmologie: Praxis Dr. G. Lippitz, Hoyerswerda
08/1998	Innere Medizin: Universitätsklinikum Charité, Berlin
08/1999	Innere Medizin: Park-Klinik Weissensee, Berlin

PRAKTISCHES JAHR

04/2000-08/2000	Chirurgie:	Evangelisches Krankenhaus Königin- Elisabeth-Herzberge Berlin
08/2000-12/2000	Innere Medizin:	Evangelisches Krankenhaus Königin- Elisabeth- Herzberge Berlin
12/2000-03/2001	Anästhesie:	University of Natal, King-Edward-VIII Hospital, Durban, Südafrika

ARZT IM PRAKTIKUM

seit 01.10.2001	III. Innere Abteilung, Station 7: Gastroenterologie Chefarzt: Dr. med. Gottschalk Vivantes Klinikum Prenzlauer Berg Fröbelstr. 15, 10405 Berlin
-----------------	--

Berlin, 17.08.2001

Karsten Mydlak

PUBLIKATIONEN

Gmehling G, Günther J, Schimke I, Mydlak K, Theres H, Scholz H, Wagner KD. Time dependent alterations in antioxidant defence and contractile function after myocardial infarction. Eur J Physiol: 2001; 441 (Suppl.): R150

Wagner KD, Gmehling G, Günther J, Stauss HM, Mydlak K, Theres H, Scholz H, Schimke I. Contractile Function of Rat Myocardium is Less Susceptible to Hypoxia/Reoxygenation After Acute Infarction. akzeptiert für Mol Cell Biochem.

Wagner KD, Eßmann V, Mydlak K, Wirth M, Gmehling G, Bohlender J, Günther J, Schimke I, Scholz H. Myocardial function of renin-angiotensinogen transgenic rats during hypoxia and reoxygenation. eingereicht beim Am J Physiol.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. I. Schimke für die umfassende fachliche und persönliche Betreuung bei der Planung der Experimente, der Auswertung der Ergebnisse und beim Verfassen der vorliegenden Arbeit. Er stand bei allen Fragen und Problemen als Ansprechpartner zur Verfügung und war so eine unverzichtbare Hilfe in allen Phasen der Arbeit. Ich danke Herrn Prof. I. Schimke für die kritischen und Durchsicht der Manuskripte und die damit verbundenen wertvollen Hinweise und Anregungen.

Fr. Chem.-Ing. Kruse danke ich für die geduldige Einweisung in die laborchemischen Untersuchungsmethoden und für die tägliche engagierte und freundliche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit. Ich bedanke mich bei ihr ferner für die unkomplizierte Organisation der Laborarbeit und die hervorragende Verpflegung.

Weiterhin danke ich:

Herrn Thomas Körnicke und Herrn Dr. H. Stauß für die Überlassung der operierten Tiere, der AG Prof. Dr. Scholz und hierbei insbesondere Herrn Dr. J. Günther und Herrn Gunnar Gmehling für die Erfassung der Daten zur kontraktile Funktion der Papillarmuskeln, Herrn Küstner für die ausgesprochen engagierte Kontrolle der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin, Franziska Lilienthal für die moralische Unterstützung, die stetige Geduld und das Verständnis, das sie bis zur Fertigstellung dieser Arbeit aufbrachte.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung und das große Interesse, mit dem sie die Arbeit verfolgten und natürlich für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.